

Aus dem Pathologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

„Die Bedeutung von BMI1 beim Cancer-Stem-Cell-Phänotyp kolo- rektaler Krebszellen“

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Achim J. Schäffauer

aus Stuttgart

2013

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. Andreas Jung

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Peter Neth

Dekan: Prof. Dr.med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2014

Inhaltsverzeichnis

Glossar	V
1.1 Zusammenfassung	IX
1.2 Summary	X
2. Einleitung.....	11
2.1 Kolorektale Karzinome: Eine Haupttodesursache in Deutschland.....	11
2.2 Therapieversagen bei kolorektalen Karzinomen	12
2.3 Modellsysteme zur Karzinogenese und Progression kolorektaler Karzinome .	15
2.4 Kolorektale Karzinome als Krebsstammzell-Erkrankungen	20
2.5 Molekulare Funktion des Stammzell-Biomarkers BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1)	22
2.6 Hypothese: Essentielle Bedeutung von BMI1 beim Krebsstammzell-Phänotyp kolorektaler Tumorzellen.....	24
3. Ergebnisse.....	28
3.1 BMI1 steigert kolorektalen ‘Cancer Stem Cells’-Anteil und ‘Cancer Stemness’	28
3.1.1 Etablierung von Primär-Tumorzelllinien aus humanem kolorektalen Karzinomgewebe.....	28
3.1.2 Funktionsverlust von BMI1 in humanen kolorektalen Primär- Tumorzelllinien	33
3.1.3 BMI1 korreliert mit dem ‘Cancer Stem Cell’-Phänotyp in der kolorektalen Tumorchierarchie	35
3.1.4 BMI1 erhält den ‘Cancer Stem Cell’-Phänotyp in humanen kolorektalen Primär-Tumorzelllinien.....	37
3.1.5 BMI1 steigert die Sphäroidausformung in humanen kolorektalen Primär-Tumorzelllinien.....	41
3.1.6 BMI1 steigert die Tumorigenität in humanen kolorektalen Primär- Tumorzelllinien	43
3.2 BMI1 steigert progressive kolorektale Tumoreigenschaften wie ‘Therapieresistenz’, ‘EMT’ und ‘Metastasierung’	44
3.2.1 Funktionsverlust von BMI1 in humanen kolorektalen Tumorzelllinien .	44
3.2.2 BMI1 erhält den ‘Cancer Stem Cell’-Phänotyp in humanen kolorektalen Tumorzelllinien	48
3.2.3 BMI1 reguliert Proliferation und Apoptose in humanen kolorektalen Tumorzelllinien	50

3.2.4 BMI1 steigert die Chemoresistenz gegenüber 5-Fluorouracil in humanen kolorektalen Tumorzelllinien	52
3.2.5 BMI1 steigert EMT und Metastasierungsfähigkeit in humanen kolorektalen Tumorzelllinien	53
4. Diskussion	57
5. Methodik	67
5.1 Zellkultur	67
5.1.1 Langzeitkultivierte Tumorzelllinien	67
5.1.2 Primär-Tumorzelllinien	67
5.2 RT-qPCR	68
5.3 Westernblot	69
5.4 RNA-interference mittels lentiviraler Transduktion	70
5.5 Zellzyklusanalysen und Wachstumskinetiken	71
5.6 Migration in Wundheilungsexperimenten	71
5.7 Invasion in Transwell-Assays	72
5.8 Kolonisationsfähigkeit in Methylzellulose-Assays	72
5.9 CD26-Immunfluoreszenzfärbungen	73
5.10 ALDH-Aktivität und FACS (ALDEFLUOR™-Kit)	73
5.11 TCF-Reporter-Assay (TOP-flash)	74
5.12 Immunhistochemie	74
5.13 Pyrosequenzierung (hotspot mutation regions)	74
5.14 Sanger-Sequenzierung	76
5.15 In vitro Ausformung von Sphäroiden	78
5.16 Tumorigenität in NOD/SCID-Mäusen	78
5.17 Metastasierung in NOD/SCID-Mäusen	79
5.18 Statistische Auswertung	79
6. Literaturverzeichnis	81
7. Anhang	98
7.1 Eidesstattliche Versicherung	98
7.2 Danksagung	99

Glossar

5-Fluor-dUMP	5-Fluor-Desoxy-Uridinmonophosphat
5-Fluor-UMP	5-Fluor-Uridinmonophosphat
5-Fluor-UTP	5-Fluor-Uridintriphosphat
5-FU	<i>5-fluorouracil</i>
ALDH	<i>aldehyde dehydrogenase</i>
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AML	akute myeloische Leukämie
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ARE	<i>adenosine and uridine rich element</i>
ASC	<i>adult stem cell</i>
ASCL2	<i>achaete-scute complex homolog 2</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>
BMI1	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1</i>
CBX	<i>chromobox homolog 1</i>
CD133	<i>prominin 1 (PROM1)</i>
CD26	<i>dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4)</i>
CDX2	<i>caudal type homeobox 2</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CpG	<i>cytosine-phosphate-guanine</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotyp</i>
CIMP⁻	<i>CIMP-positiv</i>
CIMP⁺	<i>CIMP-negativ</i>
c-MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
coCSC	<i>colorectal CSC</i>
CSC	<i>cancer stem cell</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E2F-1	<i>E2F transcription factor 1</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
Eed	<i>embryonic ectoderm development</i>

eGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELDA	<i>extreme limiting dilution analysis</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ESC	<i>embryonic stem cell</i>
EZH1	<i>enhancer of zeste homolog 1</i>
EZH2	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
E(z)	<i>zeste (Drosophila melanogaster)</i>
FAP	<i>familiäre adenomatöse Polyposis</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FFPE	<i>formalin-fixed, paraffin-embedded</i>
FoxM1	<i>forkhead box M1</i>
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
HDACi	<i>HDAC inhibitor</i>
HE	<i>haematoxylin-eosin</i>
HTCR	<i>Human Tissue & Cell Research</i>
i.c.	<i>intracardiac</i>
IgG	<i>Immunglobulin G</i>
IHC	<i>immunohistochemistry</i>
IL4	<i>Interleukin 4</i>
IRES	<i>internal ribosome entry sites</i>
ISC	<i>intestinal stem cell</i>
i.v.	<i>intravenous</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
K	<i>Lysin</i>
kb	<i>kilobase</i>
kDa	<i>kilo dalton</i>
KDM2B	<i>lysine (K)-specific demethylase 2B</i>
KRT7	<i>keratin 7</i>
KRT20	<i>keratin 20</i>
LGR5	<i>leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5</i>
LSC	<i>leukaemic stem cells</i>
M	<i>Methionin</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>

MAPKAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3</i>
MCR	<i>mutation cluster region</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MET	<i>mesenchymal-epithelial transition</i>
MMP-2	<i>matrix metalloproteinase 2</i>
MMP-9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSI1	<i>musashi RNA-binding protein 1</i>
MSI-H	<i>microsatellite instability-high grade</i>
MSS	<i>microsatellite stable</i>
MTT	<i>thiazolyl blue tetrazolium blue</i>
NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NOD/SCID	<i>non-obese diabetic / severe combined immune deficiency</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nt	<i>nucleotide</i>
p14^{ARF}	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)</i>
p16^{INK4A}	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)</i>
PARP	<i>poly-(ADP-ribose) polymerase</i>
PcG	<i>polycomb group</i>
PCGF2	<i>PcG ring finger 2</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	<i>phycoerythrin</i>
PI	<i>propidiumiodid</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PRC1	<i>polycomb repressive complex 1</i>
PRC2	<i>polycomb repressive complex 2</i>
PSC	<i>cholangitis, primary sclerosing</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
R	<i>Arginin</i>
RB	<i>retinoblastoma</i>
RING1A	<i>ring finger protein 1</i>
RING1B	<i>ring finger protein 2</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

RNAi	<i>RNA interference</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
SALL4	<i>spalt-like transcription factor 4</i>
s.c.	<i>subcutaneously</i>
SDAC	<i>spheroid derived adherent cell</i>
shBMI1	shRNA spezifisch für BMI1
shCTRL	shRNA spezifisch für eGFP (shEGFP)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SLUG	snail family zinc finger 2
SNAIL	snail family zinc finger 1
Suz12	<i>SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
TWIST1	twist basic helix-loop-helix transcription factor 1
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UPL	<i>universal probe library</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wnt	<i>wingless und intergation1</i>
ZEB1	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

1.1 Zusammenfassung

In Deutschland ist etwa jeder vierte Todesfall auf Krebserkrankungen zurückzuführen, dies entspricht im Jahr 2011 einer Mortalität von 221.591 Menschen - tendenziell steigend. Kolorektale Karzinome stellen in diesem Zusammenhang die zweithäufigste Krebstodesursache dar. Für Patienten in späten Stadien kolorektaler Karzinome ergeben sich äußerst schlechte Prognosen mit 5-Jahres-Überlebensraten von unter 10%. Dabei sind Heilungserfolge praktisch unbekannt, was bedeutet, dass Ursachen und Mechanismen der kolorektalen Karzinogenese noch unzureichend verstanden sein müssen.

Allerdings hängt dieses Therapieversagen maßgeblich von der Metastasierungsfähigkeit und der Therapieresistenz kolorektaler Krebszellen ab. Diese beiden funktionellen Eigenschaften sind mit der *cancer stemness* verknüpft, über die ausschließlich eine kleine Subpopulation aller Krebszellen charakterisiert wird, die sogenannten Krebsstammzellen (CSC). Im Rahmen des CSC-Konzeptes wurde die funktionelle Rolle von Biomarkern in der kolorektalen Karzinogenese, Krebsprogression sowie Therapieresistenz untersucht. Der Fokus wurde auf den intestinalen Stammzellmarker *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1* (BMI1) gelegt, der mit den Stadien von kolorektalen Karzinomen und einer geringeren 5-Jahres-Überlebensrate korreliert.

Hierzu wurde zum einen mit langzeitkultivierten humanen kolorektalen Tumorzelllinien gearbeitet - zum anderen mit Tumorzelllinien, die direkt aus Gewebeproben von kolorektalen Karzinomresektaten etabliert wurden. Diese neu isolierten Primärtumorzelllinien geben die Situation in humanen Tumoren besser wieder als langzeitkultivierte Tumorzelllinien. Um eine Abhängigkeit der Tumorzelllinien von BMI1 zu analysieren, wurde die BMI1-Expression mittels lentiviral transduzierter BMI1-spezifischer shRNA verringert. Der daraus resultierende Aktivitätsverlust von BMI1 reduzierte die Größe der kolorektalen CSC-Populationen und führte zu einer verminderten *cancer stemness*, EMT, Metastasierungsfähigkeit und Chemoresistenz. Zusammenfassend wurde die essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors BMI1 für die Aufrechterhaltung des CSC-Phänotyps in kolorektalen Krebszellen und den damit verbundenen malignen Eigenschaften demonstriert. Darauf aufbauend könnten neue Therapieformen und Therapiestrategien zielgerichtet gegen kolorektale CSCs entwickelt werden.

1.2 Summary

About every fourth death is caused by cancer in Germany, this correlates with a mortality of 221,591 people in 2011 - with tendency to rise. In this context colorectal cancer is the second most common cancer death. Patients in late clinical stage of colorectal cancer face bad prognoses with 5-year-survival rates of less than 10%. Thereby healing is virtually unknown, which means that causes and mechanism of colorectal carcinogenesis are deficiently understood.

Though, therapeutic success depends mainly on the colorectal cancer cell ability for metastasis and on their therapy resistance. These two functional traits are connected to the cancer stemness, which characterizes exclusively a small subpopulation of all colorectal cancer cells, the so called cancer stem cells (CSC). In the context of CSCs, biomarkers were examined for their relevance to colorectal carcinogenesis and cancer progression as well as to therapy resistance. The biomarker B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 (BMI1) was focused, which correlates with the progression of colorectal cancer and a lower 5-year-survival.

Therefore investigations were performed with long-time cultures of colorectal human cancer cell lines as well as with cell lines, which were established from tissue samples of colorectal carcinoma. These newly isolated primary cell lines describe the situation in the patient's body better than long-time cultured cell lines. In order to analyze a dependency of the cell lines on BMI1, the BMI1 expression was reduced by lentiviral transduced shRNA specific for BMI1. The resulting loss of BMI1 activity reduced the size of the CSC populations and led to reduced cancer stemness, EMT, metastatic capacity and chemoresistance. In summary the essential role of the transcription factor BMI1 was demonstrated for the maintenance of the colorectal CSC phenotype and the herewith connected malign traits. Based on these results new types and strategies of therapies might be developed, which are target-oriented against colorectal CSCs.

2. Einleitung

2.1 Kolorektale Karzinome: Eine Haupttodesursache in Deutschland

Krebserkrankungen stellen eine der Haupttodesursachen in Deutschland dar. So starb 2011 etwa jeder Vierte an deren unmittelbaren Folgen (**ABB. 1**), bei steigender Tendenz.

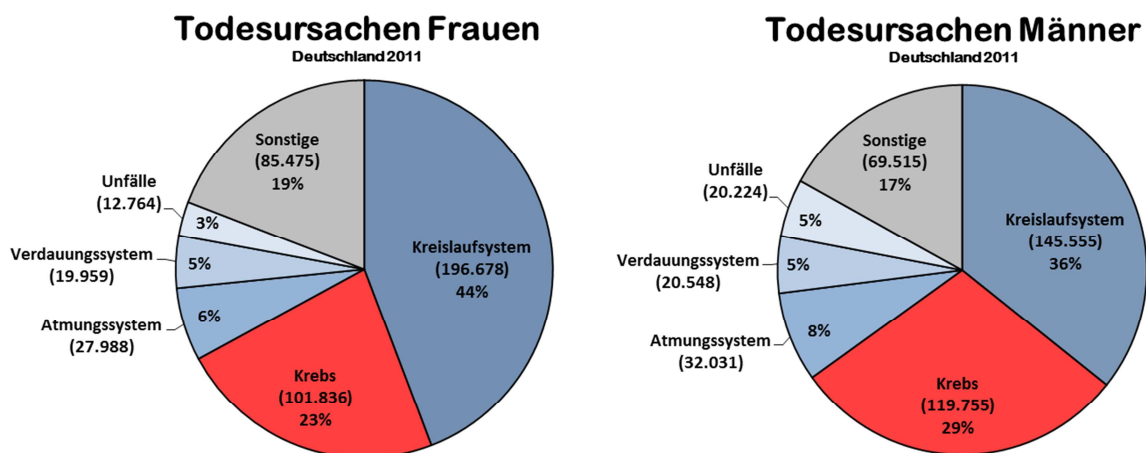


ABBILDUNG 1: HAUPTTODESURSACHEN IN DEUTSCHLAND FÜR 2011 Nach Geschlecht eingeteilt absolute und prozentuale Haupttodesursachen in Deutschland. Krebserkrankungen stellen nach den Krankheiten des Kreislaufsystems die häufigste Todesursache in Deutschland dar. (Quelle: Statistisches Bundesamt, www.destatis.de)

Kolorektale Karzinome sind geschlechtsübergreifend die am häufigsten auftretende Krebserkrankung. Die Inzidenz ist stetig angestiegen und liegt in den Vergleichsgruppen für Männer durchschnittlich höher als für Frauen (**ABB. 2**). Für 2011 wurde die Inzidenz auf insgesamt 490.000 Krebsneuerkrankungen geschätzt. Dabei liegt die Prognose für das Gesamtüberleben vor dem Auftreten von Fernmetastasen bei etwa 60% und sinkt durch Fernmetastasen auf circa 5%. Nur etwa 10% der Patienten erkranken vor dem 55. Lebensjahr, dagegen über 50% nach dem 70. Lebensjahr. Bei Männern treten kolorektale Karzinome durchschnittlich im Alter von 71 Jahren auf, bei Frauen im Alter von 75 Jahren. Die Mortalität von Krebserkrankungen in Deutschland lag 2011 bei insgesamt 221.591 Todesfällen. Auf kolorektale Karzinome entfielen dabei 25.860 (11,6%) Todesfälle, davon 13.674 (6,1%) auf Männer und 12.186 (5,5%) auf Frauen. Folglich stellen kolorektale Karzinome eine der häufigsten

Todesursachen in Deutschland dar, mit einer schlechten Prognose für Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium.

[Zentrum für Krebsregisterdaten am Robert Koch-Institut (www.rki.de); Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (www.gbe-bund.de); Statistisches Bundesamt (www.destatis.de)]

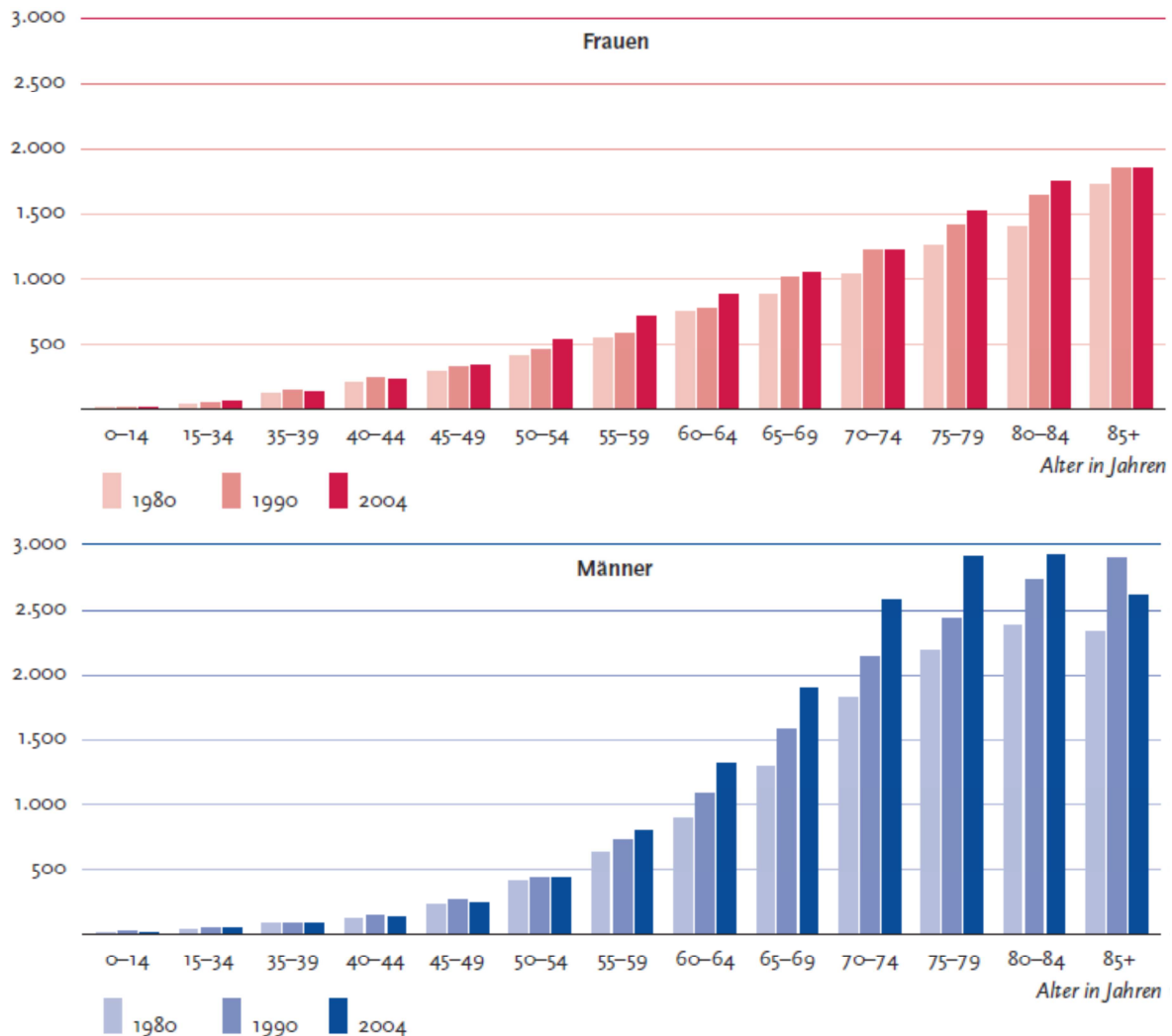


ABBILDUNG 2: ALTERSSPEZIFISCHE INZIDENZ IN DEUTSCHLAND Nach Geschlecht und Altersgruppen eingeteilte Neuerkrankungen an Krebs je 100.000 Einwohner für 1980, 1990 und 2004. Ein weiterer Anstieg der Neuerkrankungen wird für 2013 prognostiziert. (Quelle: Robert Koch Institut 2010, www.rki.de)

2.2 Therapieversagen bei kolorektalen Karzinomen

Obwohl seit vielen Jahren an Verbesserungen einer Therapie kolorektaler Karzinome geforscht wird, hat sich das Gesamtüberleben von Patienten bisher nicht deutlich verbessert (www.krebsatlas.de). Allerdings können im Rahmen einer Koloskopie be-

nigne Adenome identifiziert, klassifiziert und entfernt werden, bevor sie sich zu malignen Karzinomen entwickeln. Dadurch kann die Entstehung von kolorektalen Karzinomen reduziert werden. Weiterhin werden kolorektale Karzinome durch klinische und pathologische Untersuchungen klassifiziert. Eine pathologische Bewertung wird mittels TNM-Klassifikation durchgeführt, in der (T1-4) für die graduelle Tiefeninfiltration des Tumors, (N0-2) für die Zahl und Lage der durch Metastasen befallenen Lymphknoten und (M0 und M1) für das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen steht (Schmiegel et al., 2008). Eine klinische Bewertung findet beispielsweise über den Ausgangszustand des Patienten mittels ECOG-Index (0 bis 4) statt. Um anhand dieser beiden Klassifikationen das weitere Vorgehen zu bestimmen, werden kolorektale Karzinome in vier UICC-Stadien unterteilt (**TAB. 1**). Dabei kann man die Bedeutung der UICC-Klassifikation auch daran erkennen, dass sie nicht nur von der *Union for International Cancer Control* (UICC) sondern auch von der *World Health Organization* (WHO) verwendet wird.

TABELLE 1: UICC-KLASSIFIKATION UND 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN VON PATIENTEN MIT KOLOREKTALEN KARZINOMEN (nach www.uicc.org und www.medmedia.at)

UICC	T	N	M	ECOG	5-Jahres-OS
Stadium I	T1/T2	N0	M0	0	93%
Stadium IIa	T3	N0	M0	1 bis 4	85%
Stadium IIb	T4	N0	M0		72%
Stadium IIIa	T1/T2	N1	M0	1 bis 4	83%
Stadium IIIb	T2/T3	N1	M0		63%
Stadium IIIc	Jedes T	N2	M0		44%
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1	1 bis 4	8%

Für die frühen Stadien I und II kolorektaler Karzinome führten Fortschritte in chirurgischen Techniken zu 5-Jahres-Überlebensraten von über 90% (Stadium I) beziehungsweise über 70% (Stadium II). Trotzdem kann selbst bei makroskopisch vollständigen Resektionen das Auftreten von Rezidiven nicht ausgeschlossen werden.

In den fortgeschrittenen Stadien III und IV kolorektaler Karzinome wird neben einem operativen Eingriff eine multimodale Therapie aus Chemotherapie und/oder Radiotherapie eingesetzt (Edwards et al., 2012). Obwohl diese Therapieformen stetig

weiterentwickelt und durch physikalische Verfahren zur Zerstörung von Krebszellen (Lasertherapie, Kryotherapie und Hyperthermie) ergänzt werden, führen sie aufgrund von Therapieresistenzen im Regelfall nur zu temporären Remissionen. Damit ist in späten Stadien kolorektaler Karzinome eine Heilung praktisch unbekannt (5-Jahres-Überlebensraten von unter 10%).

Deshalb ist es essentiell, neue Therapien für die Behandlung kolorektaler Karzinome zu entwickeln. Dabei stellt den neuesten Ansatz in Krebstherapien die personalisierte Medizin dar, bei kolorektalen Karzinomen wird beispielsweise unter anderem der Antikörper Cetuximab eingesetzt. Dieser Antikörper bindet gezielt EGFR, wodurch die EGFR-Aktivität und nachfolgende Signalkaskaden blockiert werden. Hierbei wird angenommen, dass Krebszellen abhängiger von diesen onkogen-relevanten Signalwegen sind als normale Zellen. Dieses Konzept wurde als *oncogene addiction* beschrieben (Weinstein, 2002). Durch Hinzunahme von Cetuximab zu Standardtherapien wird in der klinischen Praxis etwa ein Monat für das Gesamtüberleben der Patienten gewonnen. Dabei konnte ein Ansprechen dieser *targeted therapy* mit bestimmten Mutationen im KRAS-Gen der Krebszellen assoziiert werden (Valtorta et al., 2013; Heinemann et al., 2013). Folglich kann in der prädiktiven Medizin prognostiziert werden, ob Patienten von einer Cetuximab Therapie profitieren. Für ein Therapieversagen von Cetuximab nach einer anfänglichen Reaktion (Misale et al., 2012) könnten therapiebedingte Selektionseffekte auf andere Mutationen, wie zum Beispiel NRAS, verantwortlich sein. Ebenso könnten allerdings Neumutationen während der Therapie zu einem Therapieversagen führen. Insgesamt scheinen KRAS-Analysen mit anschließenden Cetuximab-Therapien nicht auszureichen, um kolorektale Karzinome erfolgreich zu therapieren.

Bisher könnte der komplexe genetische Hintergrund bei Krebserkrankungen nicht genügend berücksichtigt worden sein. Deshalb sollten vor Therapiebeginn alle für Krebserkrankungen relevanten Mutationseignisse analysiert und im Falle von erworbenen Therapieresistenzen mittels Monitoring verfolgt werden. Dieser Ansatz wird erst durch technische Weiterentwicklungen wie dem *next generation sequencing* ermöglicht. Ein Beispiel, bei dem komplette DNA-Sequenzen und Transkriptome eines Patienten analysiert werden können, ist das *whole genome sequencing* (Roychowdhury et al., 2011). Daraus könnte in Kombination mit Informationen aus epigenomischen Analysen eine optimale Kombination aus verfügbaren Einzeltherapien bioinformatisch ermittelt werden (Bock and Lengauer, 2012). Um mittels Kombi-

nationstherapien existierende Therapieresistenzen zu überwinden oder durch Selektion und Neumutation aufgebaute Resistenzen zu durchbrechen, wäre allerdings eine entsprechend große Auswahl an Einzeltherapien nötig. Die momentane Anzahl an wirksamen Einzeltherapien, wie beispielsweise Cetuximab, reicht hierfür nicht aus. Demnach müssen dringend neue Therapieansätze verfolgt und schnellstmöglich in eine klinische Anwendung überführt werden. Aus den daraus resultierenden Kombinationstherapien könnten Krebserkrankungen theoretisch langfristig gestoppt, zurückgedrängt oder sogar vollständig geheilt werden.

Zusammenfassend wurde in der klinischen Forschung bisher kein nennenswerter Heilungserfolg von kolorektalen Krebserkrankungen erreicht, trotz eines grundlegenden Verständnisses der Pathogenese. Dies deutet darauf hin, dass Ursachen und Mechanismen noch unzureichend verstanden sind und somit in Therapien nicht berücksichtigt werden können.

2.3 Modellsysteme zur Karzinogenese und Progression kolorektaler Karzinome

Obwohl die Entstehung kolorektaler Karzinome gut untersucht und grundlegend verstanden ist, konnten diese Erkenntnisse bisher in keine erfolgreiche Therapie umgesetzt werden. Ein Therapieversagen bei kolorektalen Karzinomen wird hauptsächlich durch Resistenzen bezüglich der zugelassenen Chemotherapeutika verursacht und bewirkt, dass über 90% dieser Patienten an Metastasen versterben.

Um die Prozesse der Metastasierung und Therapieresistenz zu verstehen, wurden verschiedenen Theorien geschaffen, auf die im Folgenden chronologisch eingegangen wird. Die Entstehung kolorektaler Karzinome lässt sich histologisch durch Veränderungen der Gewebearchitektur leicht nachverfolgen. Dabei handelt es sich um eine stufenweise Entwicklung von Adenomen zu Karzinomen, welche als Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben wurde (Muto et al., 1975). Da mit dieser Sequenz Mutationen sowohl in Onkogenen als auch in Tumorsuppressorgenen einhergehen, konnten im *multistep colorectal carcinogenesis model* (**ABB. 3-A**) den einzelnen Stufen der Adenom-Karzinom-Sequenz unterschiedliche Mutationen zugeordnet werden (Vogelstein et al., 1988). Diese selten auftretenden Mutationereignisse müssen akkumulieren, damit kolorektale Epithelzellen vollständig zu malignen Tu-

morzellen transformieren können. Hierbei adaptieren Zellen schrittweise essentielle Eigenschaften der Karzinogenese, wie etwa unabhängiges Wachstum, Migration oder Invasion. Folglich sind in diesem linearen Progressionsmodell alle Krebszellen bezüglich genetischer und epigenetischer Veränderungen monoklonal. Im Rahmen dieses Modelles sollten deshalb nahezu alle Krebszellen in metastasierenden kolorektalen Karzinomen über metastasierende und damit mesenchymale Eigenschaften verfügen.

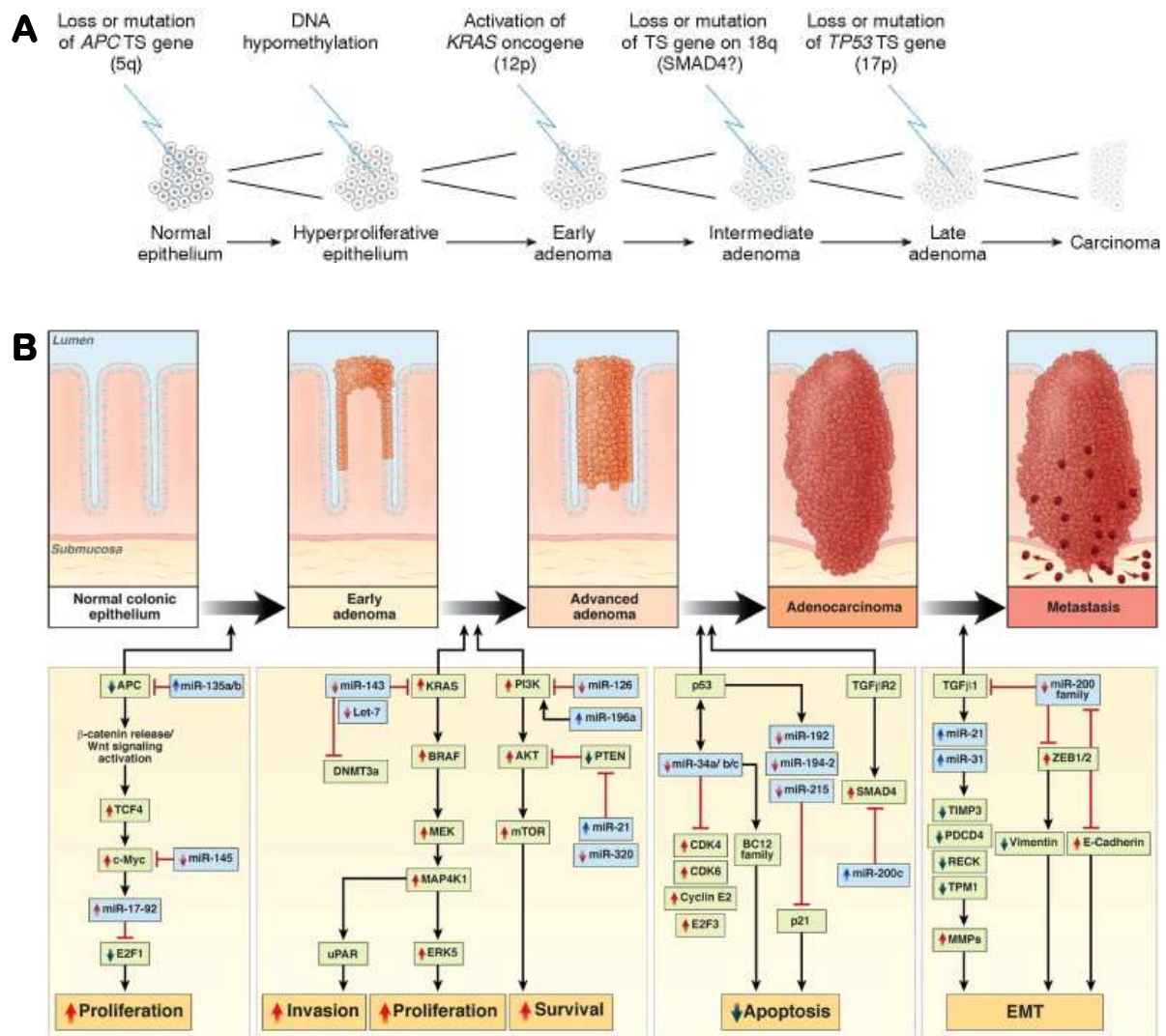


ABBILDUNG 3: DAS MULTISTEP COLORECTAL CARCINOGENESIS MODEL (A) Schematische Darstellung des *multistep colorectal carcinogenesis model* als lineares Progressionsmodell nach (Vogelstein et al., 1988). **(B)** Der Einfluss (↑ Anstieg, ↓ Abfall) von validierten Zielgenen (grün) und identifizierten miRNAs (blau) auf progressive Zelleigenschaften im *multistep colorectal carcinogenesis model*. (nach (Goel and Boland, 2012))

Allerdings wurden im Rahmen des *multistep carcinogenesis model* immer mehr Mutationen identifiziert. Dadurch entstanden immer komplexere Mutationskarten

(**ABB. 3-B**), in denen verschiedene Mutationseignisse wenigen biologischen Funktionen zugeordnet werden konnten. Diese Funktionen wurden zweimal in den *hallmarks of cancer* beschrieben:

Hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg, 2000)

- (1) Proliferation (*sustaining proliferative signaling*)
- (2) Resistenz (*evading growth suppressors*)
- (3) Apoptose (*resisting cell death*)
- (4) Angiogenese (*inducing angiogenesis*)
- (5) Immortalisierung (*enabling replicative immortality*)
- (6) Metastasierung (*activating invasion and metastasis*)

Hallmarks of cancer: the next generation (Hanahan and Weinberg, 2011):

- (7) Deregulierter Metabolismus (*deregulating cellular energetics*)
- (8) Immunevasion (*avoiding immune destruction*)
- (9) Genominstabilität (*genom instability and mutation*)
- (10) Inflammation (*tumor promoting inflammation*)

Dabei wurden die *hallmarks of cancer* als essentielle Eigenschaften, die gesunde Zellen adaptieren müssen, um zu malignen Krebszellen zu transformieren, ausgewählt. Deshalb besteht ein entscheidender Kritikpunkt an den *hallmarks of cancer* darin, nicht ausschließlich auf maligne Krebszellen beschränkt zu sein (Lazebnik, 2010). Zudem wachsen in kolorektalen Karzinomen sowohl unterschiedlich differenzierte Zelltypen als auch dedifferenzierte Zellen simultan nebeneinander. Dabei ist der dedifferenzierte Phänotyp durch eine funktionelle Aktivierung des Wnt-Signalweges gekennzeichnet und kann somit mittels einer nukleären Expression von CTNNB1 identifiziert werden. Bei einer Analyse des nukleäres CTNNB1 in kolorektalen Karzinomen befindet es sich vorwiegend am Übergang zwischen Tumor- und Normalgewebe und nur in geringem Umfang in zentralen Tumorebenen. Hierbei nimmt die nukleäre CTNNB1 Konzentration graduell von Invasionsfront zu Tumorzentrum ab (Brabletz et al., 1998). Folglich stellen dedifferenzierte Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften nur einen kleinen Teil aller Tumorzellen dar. Dies widerspricht dem linearen Progressionsmodell, nach dem durch einen monoklonalen Ursprung nahezu alle Tumorzellen mesenchymale Eigenschaften besitzen sollten. Weiterhin bildet sich diese histologische Heterogenität nicht nur in Primärtumoren, son-

dern ebenso in Metastasen aus (Brabletz et al., 2001). Da ausschließlich Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften zur Metastasierung in der Lage sind und genetische Veränderungen zu einem mesenchymalen Phänotyps irreversibel sind, müssen zusätzliche regulatorische Mechanismen vorhanden sein. Diese könnten metastasierenden Krebszellen mit mesenchymalen Eigenschaften eine Plastizität in die Richtung von differenzierten Epithelzellen ermöglichen. Dadurch könnten in Fernmetastasen differenzierte Epithelzellen entstehen. Hier bietet weder das *multistep colorectal carcinogenesis model* noch das klassische *hallmark of cancer concept* Erklärungsmöglichkeiten.

Einen Ausweg aus diesem Dilemma zeigt das klassische *cancer stem cell model* auf, indem eine Tumorchierarchie vorgeschlagen wird. Hierbei steht an der Hierarchiespitze eine Subpopulation aller Krebszellen mit Stammzeleigenschaften, vergleichbar zur Hierarchiestruktur von ASCs. Diese sogenannten CSCs können sich unbegrenzt selbst erhalten und zugleich alle differenzierten Zelltypen eines Tumors ausbilden (**ABB. 4-B**). Dadurch erzeugen CSCs das heterogene und stark regulierte Gesamtbild kolorektaler Krebszellen. Eine hierarchische Organisation wurde zunächst im Kontext akuter myeloischer Leukämie entdeckt, da nur eine kleine Subpopulation der entnommenen Leukämiezellen dieselbe Krebserkrankung reproduzieren konnte (Bonnet and Dick, 1997). Danach wurden CSCs in soliden Tumoren von Brustkrebs (Dontu et al., 2003) und Gehirntumoren (Singh et al., 2004) nachgewiesen. Weiterhin konnten CSCs in Prostatakrebs (Collins et al., 2005), Eierstockkrebs (Bapat et al., 2005), Hautkrebs (Fang et al., 2005) und kolorektalen Karzinomen (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Todaro et al., 2007; Dalerba et al., 2007) gefunden werden. Aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit und ihrer hohen Plastizität sind CSCs experimentell schwer greifbar, weshalb sie über eine Reihe von funktionellen Eigenschaften definiert wurden (Reya et al., 2001; Dick, 2008; Clevers, 2011). Dazu gehörten die klassischen CSC-Eigenschaften der in vitro Ausformung von Sphäroiden und der Tumorigenität von Xeno-Transplantaten in immundefizienten Mäusen. Weitere Eigenschaften sind die Chemoresistenz und die Metastasierungsfähigkeit (**ABB. 4-C**).

In der Metastasierung brechen Krebszellen mittels Migration und Invasion aus dem Verband des Primärtumors aus und infiltrieren das umgebende Gewebe. Dabei gelangen sie durch Intravasation auch in das Lymphsystem und die Blutbahn und er-

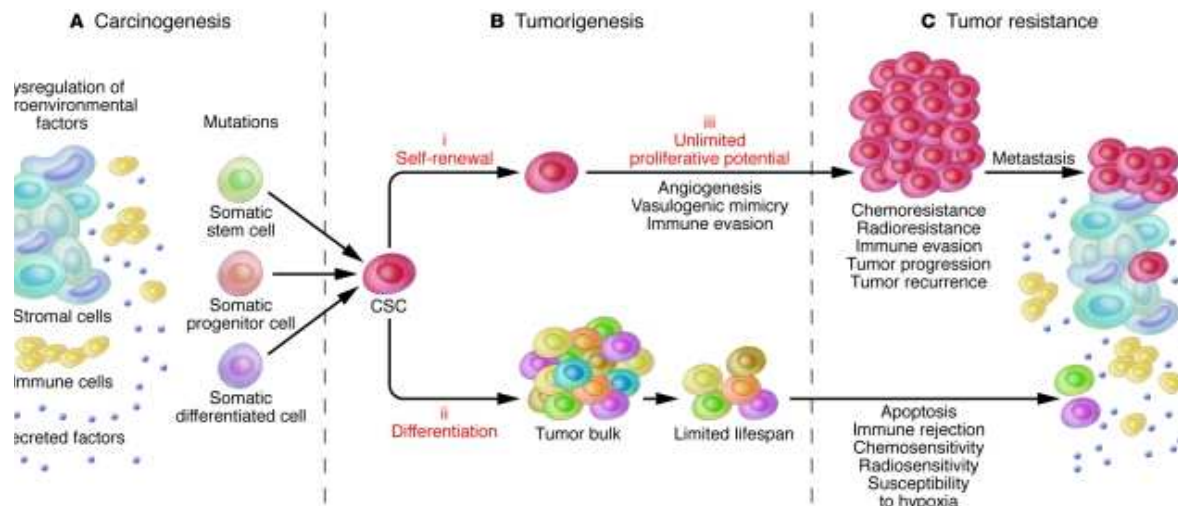


ABBILDUNG 4: KARZINOGENESE, TUMORIGENESE UND RESISTENZ IM CANCER STEM CELL MODEL
(A) Als Ausgangspunkt einer malignen Transformation kommen sowohl adulte Stammzellen als auch differenziertere Vorläuferzellen oder somatische Zellen in Frage. Auslöser dieser Transformation sind Mutationsereignisse ergänzt durch extrinsische Faktoren. **(B)** Tumorigenität wird maßgeblich durch drei Eigenschaften der CSCs angetrieben, (i) Selbsterneuerung (ii) Differenzierungskapazität und (iii) Immortalisierung. **(C)** CSCs zeigen eine erhöhte Resistenz gegen Chemotherapien, Radiotherapien sowie Immunreaktionen. Diese resistenten CSCs treiben zugleich die Tumorprogression und Metastasierung an. (nach (Frank et al., 2010))

reichen durch Zirkulation in diesen Systemen entfernte Gewebe. Treffen Krebszellen dabei auf ein geeignetes Wirtsgewebe, verbleiben sie in Mikrogefäßen und führen eine Extravasation durch. Dort bilden diese Krebszellen zunächst Mikrometastasen und anschließend mittels einer Kolonisation sogenannte Fernmetastasen aus. Dieser Metastasierungsvorgang erfordert eine komplexe und plastische Regulation der metastasierenden CSCs. Daran beteiligt sind zum Beispiel EMT und MET. In einer EMT adaptieren epitheliale Krebszellen Eigenschaften eines mesenchymalen Phänotyps, der beispielsweise mit invasivem und migrativem Verhalten einhergeht (Thiery et al., 2009; Yilmaz and Christofori, 2010). Im gegenläufigen Prozess der MET durchlaufen Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften eine Transdifferenzierung zu einem epithelialen Phänotyp, der beispielsweise Voraussetzung für eine Kolonisation ist. Folglich stellt diese EMT/MET Plastizität (Thiery et al., 2009; Schubert and Brabletz, 2011) von CSC-Populationen eine Notwendigkeit für Metastasierung dar. Daneben konnte die Plastizität von CSC-Populationen ebenfalls in einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in differenzierteren Krebszellen und der daran gekoppelten Stammzeleigenschaften demonstriert werden (Vermeulen et al., 2010). Diese Aktivierung wurde durch von Myofibroblasten sekretiertem HGF hervorgerufen. Dabei ist HGF nicht der einzige extrinsische Faktor mit einer Wirkung auf kolorektale CSCs (**ABB. 4-A**), sodass die Krebsprogression von der Tumormikroumgebung durch Fibroblas-

ten, ECM (Bissell and Labarge, 2005) und vielen weiteren Komponenten beeinflusst wird. Eine dieser Komponenten ist essentiell für die Metastasierung, nämlich das Immunsystem (Mantovani, 2009). Durch diese extrinsischen Signale unterscheiden sich Krebszellen vor allem in ihrer räumlichen Lage und den damit verknüpften temporären und reversiblen Signalen voneinander. Demnach hat sich das klassische *cancer stem cell model* zu einem Modell der plastischen CSC-Populationen gewandelt.

Eine weitere Konzeption, um Heterogenität im Rahmen von CSCs zu beschreiben, ist die genetische Divergenz. So wurde eine heterogene CSC-Klonalität in Tumoren demonstriert, indem aus einem parentalen kolorektalen CSC-Klon mehrere CSC-Subklone abgeleitet wurden (Odoux et al., 2008). Eine daraus resultierende multiple Hierarchiespitze kolorektaler Karzinome würde aus einem einzelnen CSC-Klon und seinen Nachkommen bestehen. Andererseits könnten auch mehrere CSC-Klone mit völlig unterschiedlichem genetischem Hintergrund eine Hierarchiespitze ausbilden. Diese Koexistenz mehrerer CSC-Klone wird in nicht überlappenden Biomarkerexpressionen in Brustkrebs angedeutet (Anderson et al., 2011b). In diesem Fall könnten voneinander unabhängige CSC-Klone miteinander konkurrieren und dadurch die Tumorprogression vorantreiben. (Bacelli and Trumpp, 2012). Daneben wird diese Heterogenität von Mutationseignissen in Tumoren durch Untersuchungen verschiedener Gewebeareale, zum Beispiel mittels Mikrodissektion, unterstützt (Baldus et al., 2010).

Zusammenfassend scheint es Krebserkrankungen zu geben, die einzig durch CSCs angetrieben werden. Dabei wird das *cancer stem cell model* durch Plastizität und Heterogenität der CSC-Populationen immer komplexer.

2.4 Kolorektale Karzinome als Krebsstammzell-Erkrankungen

Mit Hilfe des *cancer stem cell model* lassen sich die im Therapieversagen entstehenden Rezidive und Chemoresistenzen kolorektaler Karzinome erklären (siehe 2.2). Denn als Charakteristikum für CSCs steht ein extrem langsamer beziehungsweise ruhender Zellzyklus zur Diskussion. Durch diesen potentiell ruhenden Zellzyklus sind CSCs resistent gegenüber Einflüssen von Therapien. Demnach könnten CSCs, die nach einer abgeschlossenen Therapie ruhen, reaktiviert werden, um daraufhin Re-

zidive auszubilden (Aguirre-Ghiso, 2007; Pantel et al., 2009). Nach diesem Prinzip besteht allgemein durch Therapieresistenzen ein Risiko des erneuten Ausbruchs der Krebserkrankung aufgrund von nicht vollständig eliminierten CSC-Populationen. Darum wurde vorgeschlagen, Therapieerfolge nicht wie bisher anhand von Tumorrückbildungsraten zu bestimmen, sondern anhand der Quantifizierung von verbleibenden CSCs (Blagosklonny, 2006). Für eine Quantifizierung plastischer CSC-Populationen müssen die vorhandenen CSCs bei einer Krebserkrankung mittels spezifischer Biomarker verfolgt werden können. Hierzu wurde zuerst bei Patienten mit AML die Existenz von $CD34^+/CD38^-$ CSCs nachgewiesen (Lapidot et al., 1994; Bonnet and Dick, 1997), welche inzwischen in unterschiedliche CSC-Klone eingeteilt werden können (Gibbs, Jr. et al., 2012). In soliden Tumoren konnte erstmals bei Brustkrebs eine $ESA^+/CD44^+/CD24^{low}$ CSC-Population identifiziert werden (Al-Hajj et al., 2003). Inzwischen konnten in diesen CSC-Populationen mehrere Subpopulationen nachgewiesen (Ginestier et al., 2007) und damit verschiedene Subklassen bestimmt werden (Curtis et al., 2012). Daneben wurden mehrere Subklassen in primären CSCs aus kolorektalen Karzinomen nachgewiesen (Dieter et al., 2011) welche eine zukünftige Einteilung kolorektaler CSC-Populationen wahrscheinlich erscheinen lassen.

Für eine Ausbildung von Therapieresistenzen stehen CSCs mehrere Mechanismen zur Verfügung. Eine erste Möglichkeit hierzu besteht in einem reduzierten Transport von Chemotherapeutika ins Zellinnere oder durch einen aktiven Transport aus dem Zellinnern (Tsuruo, 1990). Dieser Abtransport kann zum Beispiel durch erhöhte Expressionen des MDR-Transporters erreicht werden (Dean et al., 2005). Ein zweiter Ansatz zur Ausbildung von Therapieresistenzen liegt in einer gesteigerten Aktivität der DNA-Reparaturmechanismen, um einer Schädigung der DNA durch Chemotherapeutika entgegen zu wirken (Bao et al., 2006). Ein dritter Mechanismus gründet auf Veränderungen in Signalkaskaden, beispielsweise verhindert von Tumoren selbsthergestelltes IL4 eine therapiebedingte Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika (Todaro et al., 2007). Eine vierte Möglichkeit basiert auf dem Wegfall von Zielstrukturen zielgerichteter Therapien durch Mutationsereignisse, wie EGFR bei Cetuximab-Therapien (Damiano et al., 2007; Misale et al., 2012; Chen et al., 2010). Neben diesen Mechanismen wurde eine Korrelation von ALDH-Aktivität in Brustkrebszellen mit der Resistenz gegen Cyclophosphamide beobachtet (Sladek et al., 2002; Douville et al., 2009). Solche ALDH-Aktivierungen wurden ebenfalls in

mehreren anderen Krebsarten gefunden (Huang et al., 2009; Ginestier et al., 2007; Pearce et al., 2005).

Neben dem Therapieversagen sind kolorektale CSCs ebenfalls für die Metastasierung, die die Haupttodesursache für Patienten mit kolorektalen Karzinomen darstellt, verantwortlich. Hier spielt einerseits die EMT bei der Metastasierungsfähigkeit andererseits die Tumorigenität bei der Kolonisationsfähigkeit eine wesentliche Rolle. Experimentelle Metastasierung wird als Goldstandard durch *in vivo imaging* von injizierten Krebszellen in immundefizienten Mäusen untersucht, wodurch die Ausbildung von Fernmetastasen beobachtet werden kann (Pang et al., 2010). Tumorinitiation und Tumorstadium primärer Krebszellen werden durch die Goldstandards der *in vitro* Ausformungskapazität von Sphäroiden und der subkutanen Xeno-Transplantation in immundefiziente Mäuse analysiert (O'Brien et al., 2007; Todaro et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Dalerba et al., 2007). Im Rahmen dieser Experimente konnten kolorektale CSCs als metastasierende Krebszellen in kolorektalen Karzinomen identifiziert werden. Zusammenfassend verursachen und steuern kolorektale CSCs somit beispielsweise durch Therapieresistenz und Metastasierung den Krankheitsverlauf von Patienten mit kolorektalen Karzinomen.

2.5 Molekulare Funktion des Stammzell-Biomarkers BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1)

Obwohl Stammzellen schon lange bekannt sind (Spangrude et al., 1988), wurde ihr Potential als Modellsystem erst vor Kurzen insbesondere durch Arbeiten mit embryonalen Stammzellen realisiert (Boiani and Scholer, 2005). Dabei wurden mehrere Transkriptionsfaktoren als Master-Regulatoren von pluripotenten und multipotenten Stammzellen identifiziert (Niwa, 2007) und zudem epigenetische Modifikationen in der Stammzellregulation diskutiert, wie beispielsweise durch Polycomb Group (PcG) Proteine (Simon and Kingston, 2009). PcG-Proteine wurden als evolutionär konservierte Regulatoren in der Entwicklungsbiologie entdeckt. Diese Proteine bilden chromatinmodifizierende Komplexe aus, die eine transkriptionelle Stilllegung von Genen in Eukaryoten umsetzen. Es gibt zwei PcG-Hauptkomplexe, den Polycomb repressive complex 1 (PRC1) und den PRC2 (Schwartz and Pirrotta, 2007; Martinez and Cavalli, 2006; Simon and Kingston, 2009).

Bmi1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1) wurde als erstes Protein der PcG-Proteinfamilie in Säugetieren entdeckt im Zusammenhang der Lymphombildung als Onkogen, das mit Myc zusammenwirkte (Haupt et al., 1991; van Lohuizen M. et al., 1991). Das humane BMI1-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 10 (10p11.23) lokalisiert und umfasst 10 Exon-Regionen sowie 9 Intron-Regionen. Dieses Gen kodiert cDNA von circa 3,4 kb Länge sowie ein Protein mit 326 Aminosäuren und etwa 36,8 kDa. Das BMI1-Protein enthält eine für seine Aktivität entscheidende konservierte Ringfinger-Domäne am N-terminalen Ende sowie ein zentrales helix-turn-helix-turn Motiv. Zudem enthält BMI1 zwei kernlokalisierende Signale KRRR und KRMK (Siddique and Saleem, 2012).

Bmi1 ist Bestandteil des PRC1 Proteinkomplexes. In Säugetieren kann die Zusammensetzung des PRC1 variieren (Gao et al., 2012; Luis et al., 2012). Allerdings enthalten alle PRC1-Komplexe Homologe der Drosophila-Ring-Proteine, wie die E3-Ubiquitin-Ligasen Ring1A und Ring1B (de Napoles et al., 2004; Leeb and Wutz, 2007). Diese Ligasen markieren Lysin 119 von H2A-Histonen mit einer einzelnen Ubiquitingruppe (H2AK119ub) und führen schließlich zu einer Chromatinverdichtung (Wang et al., 2004). Weiterhin wird durch Homologe des Drosophila-Gens Psc die Enzymaktivität des PRC1-Komplexes reguliert, dazu gehört Bmi1 (Brunk et al., 1991; Kanno et al., 1995). Bmi1 reguliert eine Vielzahl an Genen: Erstens regulierte BMI1 beispielsweise die transkriptionelle Expression des Tumorsuppressorgens PTEN durch direkte Assoziation mit dem PTEN-Genlokus (Song et al., 2009). Zweitens, unterdrückte BMI1 und Twist1 kooperativ die Expression von E-Cadherin und p16^{INK4A} (Yang et al., 2010). Drittens aktivierte BMI1 NF-κB und die Expression von Downstream-Genen wie PARP, BCL2L1 und c-MYC (Li et al., 2010b). Viertens inhibierte BMI1 den PI3K/Akt-Signalweg und vermindert die Expression und Aktivität von MMP-2, MMP-9 und VEGF (Li et al., 2013). Dabei gibt es immer mehr Hinweise dafür, dass die Deregulierung der BMI1-Expression zur Krebsentwicklung beiträgt.

Der PRC2 wird durch spezifische Faktoren an genomischen Loci rekrutiert und führt wiederum zu einer Markierung für die Rekrutierung des PRC1. Dabei wird in Säugetieren durch die Histon-Methyltransferasen Ezh1 und Ezh2, Homologe des Drosophila-Gens E(z), die PRC2-Aktivität gesteuert (Margueron et al., 2008). Weitere Drosophila-Homologe wie Suz12 und Eed sind für die Komplexbildung und Enzymaktivität von PRC2 notwendig (Cao and Zhang, 2004; Ketel et al., 2005). Die Histon-Methyltransferasen methylieren Lysin 27 des H3 Histon mit einer Trimethylgruppe

(H3K27me3) und erreichen dadurch eine Genstilllegung. Zudem binden Cbx-Proteine an H3K27me3 und markieren diese für den kanonischen PRC1 (Fischle et al., 2003).

Allerdings ist H3K27me3 nicht immer ausreichend für die Rekrutierung von PRC1 (Schoeftner et al., 2006; Tavares et al., 2012). Neben dem Zusammenspiel der kanonischen PRC1/PRC2-Komplexe ist eine Rekrutierung von nicht kanonischen PRC1-Komplexen an spezifischen unmethylierten CpG-Islands über die PRC1-Untereinheit Kdm2b möglich (Farcas et al., 2012; He et al., 2013; Wu et al., 2013).

2.6 Hypothese: Essentielle Bedeutung von BMI1 beim Krebsstammzell-Phänotyp kolorektaler Tumorzellen

Für die Entwicklung des *cancer stem cell model* wurden starke Parallelen zum gut verstandenen *adult stem cell model* genutzt. Dazu gehören, neben einer hierarchischen Organisationsform, gemeinsame Stammzellfähigkeiten der ASC- und CSC-Populationen wie zum Beispiel Selbsterneuerung beziehungsweise Differenzierungspotential sowie Plastizität der Zellpopulationen oder Resistenzen. Diese Stammzellcharakteristika setzen eine äußerst sorgfältige Regulation voraus, wofür Signalkaskaden sowohl von ASCs als auch von CSCs eingesetzt werden. Bei kolorektalen Stammzellen nimmt der Wnt-Signalweg die zentrale Rolle ein. Dies zeigte sich beispielsweise in Experimenten mit transgenen Mäusen, die einen Knockdown von CTNNB1 (Fevr et al., 2007) oder Tcf4 (Korinek et al., 1998) als zentrale Moleküle des Wnt-Signalweges aufwiesen. Beide Modelle führten zu einem Verlust des adulten Stammzellkompartiments und als Folge zum Zusammenbruch der Kryptenarchitektur. Für kolorektale Karzinome zeigt sich die Bedeutung des Wnt-Signalweges zum Beispiel bei FAP-Patienten mit einem angeborenen defekten APC-Gen als Komponente des Wnt-Signalweges. Diese Patienten entwickeln bereits vor dem Erwachsenenalter hunderte von Darmpolypen und weiterführend mit annähernd hundertprozentiger Sicherheit kolorektale Karzinome (de la Chapelle, 2004). Insgesamt wirkt eine Vielzahl intrinsischer und extrinsischer Faktoren auf den zentralen Wnt-Signalweg ein. Beispielsweise wurde eine Modulation der CTNNB1-TCF4 Bindungsaktivität über NF-κB mit Auswirkungen auf den kanonischen Wnt-Signalweg nachgewiesen (Schwitalla et al., 2013). Zudem wurde neben dem kanonischen CTNNB1-TCF4 Signal ein vergleichbares CTNNB1-YAP1-TBX5 vermitteltes Signal beschrieben (Rosenbluh et al., 2012). Weiterhin stellen *autoloops* im Wnt-Signalweg eine Ak-

tivierungsmöglichkeit dar, was man am Beispiel des HGF-Gens als CTNNB1-Zielgen sehen kann, das wiederum durch den sekretierten Wachstumsfaktor HGF ein Wnt-Signal bewirkt (Vermeulen et al., 2010). Kürzlich wurde eine Aktivierung des Wnt-Signalweges über BMI1 beschrieben (Cho et al., 2013).

BMI1 ist in vielen ASC-Populationen essentiell für die Aufrechterhaltung von Stammzellcharakteristika (Molofsky et al., 2003; Lessard and Sauvageau, 2003; Leung et al., 2004). Da das komplette Darmepithelium kontinuierlich regeneriert wird, ist die Selbsterhaltung und Generierung von differenzierten Tochterzellen eine Hauptaufgabe der ASCs im Darm. Dies zeigt sich in einer durchschnittlichen Lebensdauer der neugebildeten differenzierten Zellen von drei bis sechs Tagen (Gregorieff and Clevers, 2005). Im Mausmodell wurden zunächst unabhängig voneinander zwei ASC-Populationen im Darmepithelium identifiziert (Potten et al., 2009). BMI1 markierte dabei eine ruhende (Sangiorgi and Capecchi, 2008), LGR5 hingegen eine schnell-proliferierende Population (Barker et al., 2007). Um diese widersprüchlichen Ergebnisse aufzuklären, wurde gezeigt, dass LGR5-Populationen aus BMI1-Populationen hervorgehen und damit BMI1-positive ASCs in der Zellhierarchie an der Spitze stehen (Yan et al., 2012).

Da BMI1 somit die zentrale Rolle für ASCs des Darms spielt, verwundert es nicht, dass bereits ein Einfluss von BMI1 auf kolorektale onkogene Eigenschaften demonstriert werden konnte. Beispielsweise wurde ein Zusammenhang von BMI1 mit der Proliferation aufgezeigt, indem BMI1 mit einer verminderten $p14^{\text{ARF}}$ und $p16^{\text{INK4A}}$ Expression in kolorektalen Karzinomen assoziiert wurde (Kim et al., 2004). Bekanntermaßen fördert BMI1, vermittelt über $p14^{\text{ARF}}$ und $p16^{\text{INK4A}}$, den Zellzyklus (Dimri et al., 2002; Park et al., 2004; Molofsky et al., 2005). Dabei induziert das Tumorsuppressorgen $p14^{\text{ARF}}$ (Homolog des murinen $p19^{\text{ARF}}$) einen über p53-vermittelten Zellzyklusarrest (Raimondi et al., 2010). Hingegen inhibiert das Tumorsuppressorgen $p16^{\text{INK4A}}$ die RB-Aktivität und induziert zugleich ein Zellzyklusarrest (Jacobs et al., 1999; Park et al., 2004). Insgesamt aktiviert BMI1 die Proliferation über Repression von $p14^{\text{ARF}}$ /MDM2/p53 und/oder $p16^{\text{INK4A}}$ /RB. Deshalb wurde BMI1 in Zusammenhang mit dem Überwinden der $p14^{\text{ARF}}$ und $p16^{\text{INK4A}}$ Kontrollpunkte im Zellzyklus gebracht (Raaphorst, 2005), obwohl anzunehmen ist, dass trotz dieses Zusammenhanges weitere regulative Faktoren zu unterschiedlichem Wachstumsverhalten führen könnten (Tian et al., 2011).

Überdies konnte ein Zusammenhang von BMI1 mit EMT-assoziierten Molekülen wie beispielsweise PTEN, SLUG, SNAIL, TWIST1 oder VIMENTIN in unterschiedlichen Krebsarten aufgezeigt werden (Thiery et al., 2009; Raimondi et al., 2010). Darüber hinaus induzierte BMI1 über PTEN eine EMT in normalen nasopharyngealen Zellen (Song et al., 2009) und in Hals- und Kopfkrebszellen über eine Kooperation mit TWIST1 (Yang et al., 2010).

Außerdem konnte BMI1 bereits mit Chemoresistenz bei verschiedenen Krebsarten assoziiert werden (Siddique and Saleem, 2012). Beispielsweise wurde in einer Gensignatur von Patienten mit Therapieresistenzen beziehungsweise schlechten Prognosen BMI1 als ein regulativer Hauptfaktor identifiziert (Glinsky et al., 2005). Diese Signatur basierte auf fünf epithelialen Krebserkrankungen (Prostata-, Brust-, Lungen-, Eierstock- und Blasenkrebs) und fünf nicht-epithelialen Krebserkrankungen (Lymphome, Mesotheliome, Medulloblastome, Gliomstammzellen und akute myeloische Leukämie). Weiterführend konnten Korrelationen einer hohen BMI1-Expression mit Therapieresistenz bei mehreren Krebsarten validiert werden (Vormittag et al., 2009; Mihic-Probst et al., 2007; Li et al., 2010b; van Kemenade et al., 2001).

In den bisherigen Untersuchungen zum Einfluss von BMI1 auf Proliferation, EMT und Chemoresistenz wurde der Bezug von BMI1 zu CSCs nicht in den Fokus gestellt, obwohl anzunehmen ist, dass deren *cancer stemness* letztendlich den Krankheitsverlauf von Darmkrebspatienten bestimmt. Dieser Zusammenhang deutete sich auch schon in erhöhten BMI1-Expressionen zahlreicher Krebsarten an (Bertolini et al., 2009; Cao et al., 2011a; Oishi and Wang, 2011; Song et al., 2006; Cao et al., 2011a) und wurde durch eine Assoziation von BMI1-Expression mit der anderer Stammzellmarkern unterstützt (Bertolini et al., 2009; Song et al., 2006; Cao et al., 2011a; Oishi and Wang, 2011; Yin et al., 2011; Raaphorst, 2005). Neben diesen Beobachtungen konnte zunächst in Leukämien eine krankheitsinduzierende Wirkung von BMI1 nachgewiesen werden (Lessard and Sauvageau, 2003). Danach wurde der direkte Einfluss von BMI1 auf die Regulation von CSCs in Neuroblastomen demonstriert (Cui et al., 2007). Im Darm wurde BMI1 bisher nicht nur mit ASCs, sondern auch mit Tumoren des Gastrointestinaltraktes assoziiert (Reinisch et al., 2006). Dabei korrelierte BMI1 mit der Progression von kolorektalen Karzinomen (Li et al., 2010a) und einer verringerten 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten (Du et al., 2010). Allerdings wurde noch nicht untersucht, welche Funktion und damit Bedeutung BMI1 für CSCs in kolorektalen Karzinomen hat.

Diese Arbeit basiert auf der Hypothese, dass BMI1 einen fördernden und zugleich essentiellen Einfluss auf kolorektale CSC-Populationen ausübt und über deren *cancer stemness* beispielsweise zur Ausbildung der klinisch relevanten Eigenschaften Therapieresistenz und Metastasierung beiträgt. Dabei wird davon ausgegangen, dass plastische kolorektale Krebszellpopulationen durch BMI1 reguliert und aktiv in Richtung des malignen CSC-Phänotyps verschoben werden können. Aufgrund dieser Hypothese wurden insbesondere folgende Fragestellungen in dieser Dissertation bearbeitet:

- (1) Wirkt die Expression von BMI1 erhaltend auf kolorektale CSC-Populationen beziehungsweise den CSC-Phänotyp kolorektaler Tumorzellen?
- (2) Ist die Expression von BMI1 essentiell für die *Cancer-stemness*-Eigenschaften von kolorektalen CSC-Populationen?
- (3) Beeinflusst BMI1 die EMT in kolorektalen Tumorzellen und dadurch die metastasierenden Eigenschaften von kolorektalen CSC-Populationen?
- (4) Beeinflusst BMI1 die Chemoresistenz kolorektaler CSC-Populationen und trägt dadurch zum Therapieversagen bei?
- (5) Kann BMI1 genutzt werden, um existierende Therapien zu verbessern oder neue Therapien zu entwickeln?

3. Ergebnisse

3.1 BMI1 steigert kolorektalen ‘Cancer Stem Cells’-Anteil und ‘Cancer Stemness’

3.1.1 Etablierung von Primär-Tumorzelllinien aus humanem kolorektalen Karzinomgewebe

Da die Untersuchungen zur *cancer stemness* in primären Tumorzelllinien durchgeführt werden sollten (O'Brien et al., 2007; Dalerba et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Todaro et al., 2007), wurden Krebszellen direkt aus frischen Resektatgewebeproben von diagnostizierten Kolonkarzinomen isoliert und kultiviert. So konnten Primär-Tumorzelllinien etabliert werden. Es wurden insgesamt vier primäre Tumorzelllinien (coCSC-AS1, coCSC-AS2, coCSC-AS3 und coCSC-AS4) aus 22 Gewebeproben gewonnen (**ABB. 6-A**). Diese Primär-Tumorzelllinien ermöglichten relativ zeitnahe Untersuchungen von Tumorzellen der dazugehörigen humanen Krebserkrankungen. Zunächst wurde in den etablierten kolorektalen Primär-Tumorzelllinien überprüft, ob die biologische Heterogenität des ursprünglichen Tumors in Xeno-Transplantaten neu ausgebildet wurde. Dazu wurden coCSC-AS1 bis coCSC-AS4 subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert, um die daraus resultierenden Tumore histologisch zu untersuchen. Nach sechs bis zwölf Wochen entwickelten sich Tumore, aus denen FFPE-Gewebe hergestellt und dieses wiederum immunhistochemisch angefärbt wurde. Für die immunhistochemische Charakterisierung wurde die Markerkombination CDX2, KRT7 und KRT20 verwendet, ausgehend von einem kolorektalen Ursprung. Herr Dr. Dr. med. Jens Neumann (Facharzt für Pathologie) erstellte mittels dieser IHC-Ergebnisse Befunde zu den Xeno-Transplantaten (**ABB. 5**). Diese Ergebnisse waren mit den Ergebnissen aus den Patientenbefunden vergleichbar (**TAB. 2**).

TABELLE 2: PATIENTENDATEN ZU DEN VIER ETABLIERTEN HUMANEN KOLOREKTALEN PRIMÄR-TUMORZELLINIEN (HTCR-STIFTUNG ODER KOOPERATION MIT PD DR. KLAUS-PETER JANSSEN)

CSC-Kultur	Geschlecht	Alter	UICC-Stadium	Diagnose	Tumor-grad	Lokalisation
coCSC-AS1	weiblich	77	III C	Adenokarzinom	G3	Coecum
coCSC-AS2	weiblich	77	III B	Adenokarzinom	G2	Flexura hepatica
coCSC-AS3	weiblich	88	I	Adenokarzinom	G2	Colon ascendens
coCSC-AS4	männlich	60	IV A	Adenokarzinom	n/a	Sigma

So konnte einerseits die kolorektale Identität der Primär-Tumorzelllinien coCSC-AS1 bis coCSC-AS4 validiert werden. Andererseits spiegeln die Xeno-Transplantate der

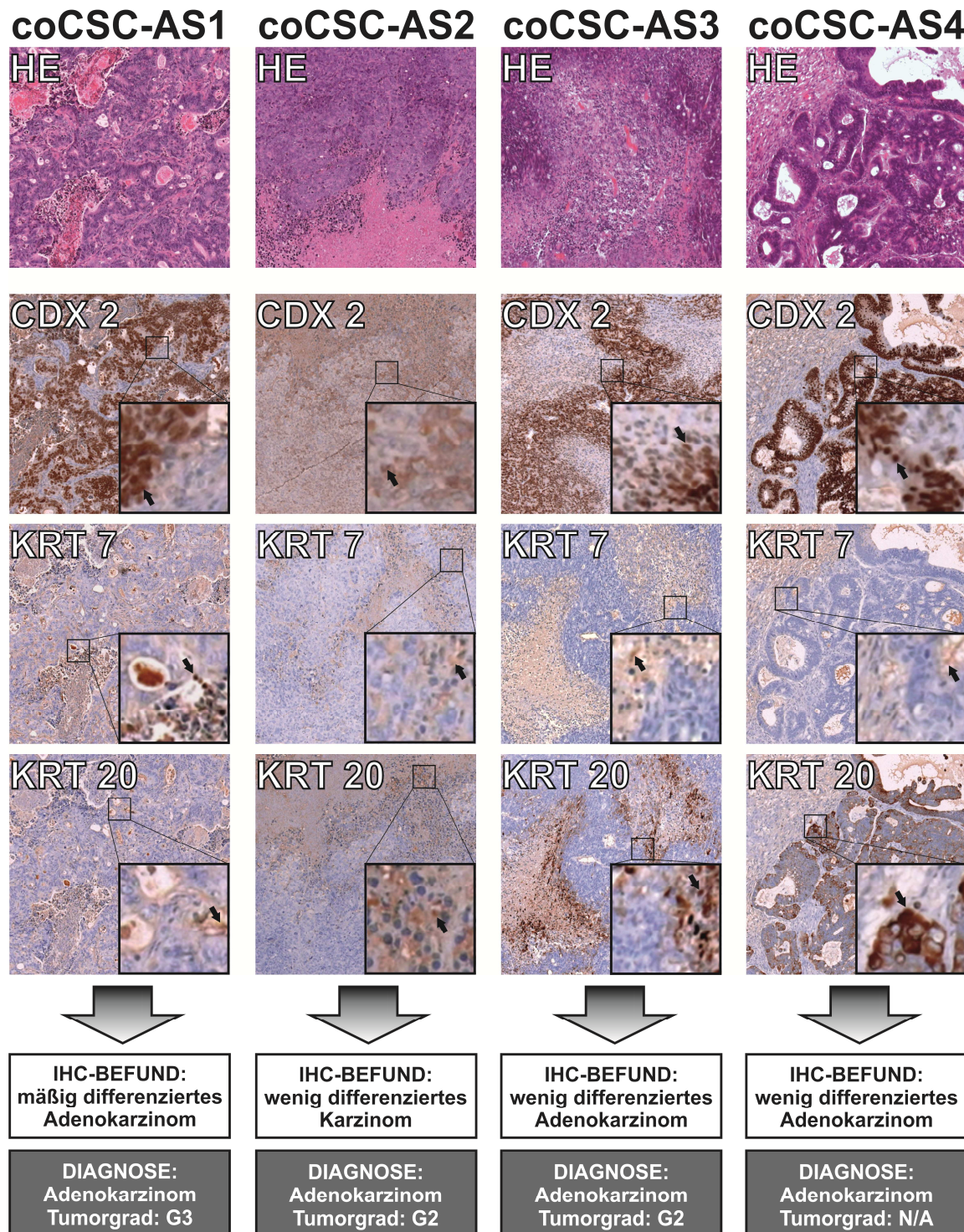


ABBILDUNG 5: IMMUNHISTOCHEMIE ZU HUMANEN KOLOREKTALEN PRIMÄR-TUMORZELLINIEN
 IHC-Färbungen von FFPE-Gewebeschnitten aus den xeno-transplantierten Primär-Tumorzelllinien coCSC-AS1 bis coCSC-AS4. Bezogen auf kolorektale Karzinome wurde die häufig verwendete Markerkombination CDX2, KRT7 und KRT20 verwendet (ergänzt durch HE). Die IHC-Befunde wurden von Herrn Dr. med. Jens Neumann (Facharzt für Pathologie) erstellt. In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt (Pfeile markieren Färbungen). Die Abbildungen wurden in einer zehnfachen Vergrößerung aufgenommen, die Bildausschnitte wurden 25-fach vergrößert.

etablierten Primär-Tumorzelllinien erwartungsgemäß die biologische Heterogenität der primären kolorektalen Karzinome wider.

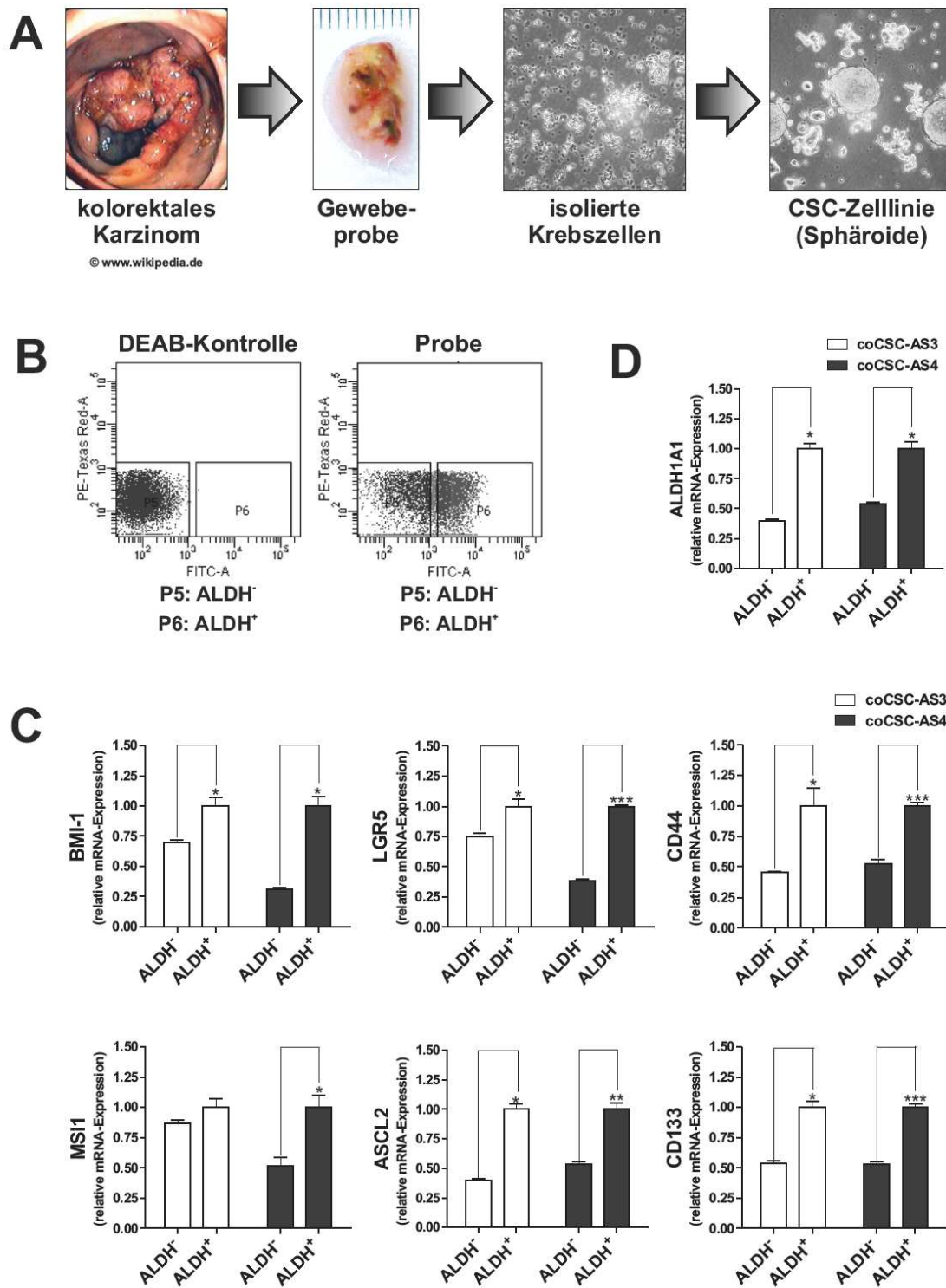
Ob bekannte Mutationseignisse aus der kolorektalen Karzinogenese für die Entstehung der malignen Eigenschaften dieser Primär-Tumorzelllinien verantwortlich waren, wurde in Mutationsanalysen untersucht. Dazu wurden der MSS- und CIMP-Status sowie aktivierende Mutationen im Wnt-Signalweg (APC, CTNNB1 und AXIN) und im MAPK-Signalweg (BRAF, KRAS und NRAS) bestimmt. Es zeigte sich, dass in den Primär-Tumorzelllinien erwartungsgemäß die MSS mit dem CIMP⁻ und die MSI-H mit dem CIMP⁺ korrelierten (**TAB. 3**). Weiterhin fanden sich in coCSC-AS1 und coCSC-AS2 bekannte Mutationen in KRAS und in coCSC-AS2 und coCSC-AS4 in APC. Folglich ließen sich die Primär-Tumorzelllinien durch verbreitete kolorektale Mutationseignisse charakterisieren.

TABELLE 3: CHARAKTERISTIKA DER HUMANEN KOLOREKTALEN PRIMÄR-TUMORZELLINIEN

CSC-Kultur	MSS-Status	CIMP-Status	APC	Axin	CTNNB1	BRAF	KRAS	NRAS
coCSC-AS1	MSS	CIMP ⁻	WT	WT	WT	WT	c.38G>A	WT
coCSC-AS2	MSS	CIMP ⁻	c.1338C>T	WT	WT	WT	c.38G>A	WT
coCSC-AS3	MSI-H	CIMP ⁺	WT	WT	WT	WT	WT	WT
coCSC-AS4	MSS	CIMP ⁻	c.2665A>T	WT	WT	WT	WT	WT

Da CSCs nicht nur histologisch eine Heterogenität ausbilden sondern auch *in vitro*, mussten für eine Untersuchung der *cancer stemness* die kolorektalen CSCs aus der Gesamtpopulation an Krebszellen angereichert werden. Dazu wurde die CSC-Eigenschaft, erhöhte Mengen ALDH zu exprimieren, eingesetzt. Damit lassen sich ALDH-aktive kolorektale CSCs markieren (Huang et al., 2009) und mittels grüner Fluoreszenz im FACS heraussortieren (**ABB. 6-B**). Allerdings fiel der durch ALDH-Sortierung gewonnene Anteil an kolorektalen CSCs gegenüber der eingesetzten Gesamtzellzahl sehr gering aus. Durch die Folgeversuche potenzierten sich die benötigten Zellzahlen, sodass aus ökonomischen Gründen nur mit zwei Primär-Tumorzelllinien weitergearbeitet wurde. Zwei Charakteristika, nach denen kolorektale Karzinome häufig unterteilt werden, sind der MSS- und der CIMP-Status, wobei MSS in der Regel mit CIMP⁻ und MSI-H mit CIMP⁺ korreliert. Um Unterschiede in diesen beiden Kolonkarzinomgruppen erfassen zu können, wurde aus jeder Gruppe je eine Primär-Tumorzelllinie ausgewählt, nämlich coCSC-AS3 (MSI-H/CIMP⁺) und coCSC-AS4 (MSS/CIMP⁻). Aus sortierten Zellen dieser Primär-Tumorzelllinien wurde RNA

isoliert und mittels RT-qPCR die Stammzell-Marker BMI1, MSI1, LGR5, ASCL2, CD44 und CD133 analysiert. Es zeigte sich, dass ALDH⁺-Zellen diese Stammzell-marker stärker exprimierten als ALDH⁻-Zellen (**ABB. 6-C**). Dies war ein Indikator für einen größeren CSC-Anteil und größere *cancer stemness* in ALDH⁺-Zellen. Weiterhin konnte der Sortierungserfolg durch die ALDH-Expression validiert werden (**ABB. 6-D**)



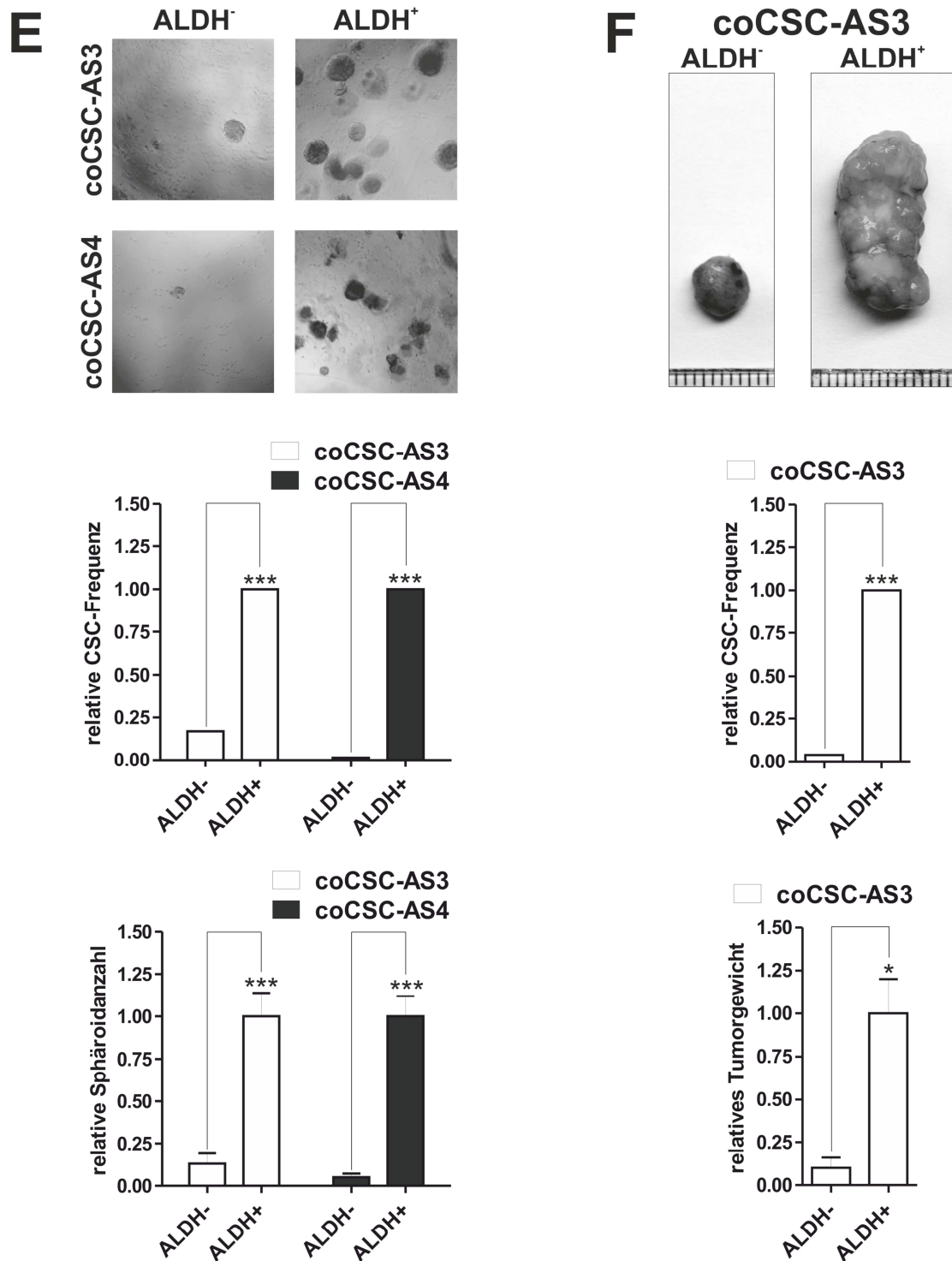


ABBILDUNG 6: ETABLIERUNG VON PRIMÄR-TUMORZELLINIEN AUS HUMANEM KOLOREKTALEM KARZINOMGEWEBE (A) Schema zur Etablierung kolorektaler Primär-Tumorzelllinien direkt aus Kolonkarzinomproben (B) FACS-Isolierung der in P6 markierten ALDH-aktiven kolorektalen CSCs (ALDH⁺) und in P5 markierten ALDH-inaktiven Kontrollzellen (ALDH⁻) (Durchführung an der „Flow Cytometry Core Unit“ der TUM) (C) mRNA-Expression von ALDH1A1 der FACS-isolierten Zellpopulationen (n=3) (D) mRNA-Expressionsprofil der stammzellassoziierten Biomarker BMI1, MSI1, LGR5, ASCL2, CD44 und CD133 der FACS-isolierten Zellpopulationen (n=3) (E) Sphäroidbildungskapazität von ALDH⁺-Zellpopulationen, sowie Bestimmung der CSC-Frequenz über ELDA (F) Tumorigenität von ALDH⁺-Zellpopulationen in NOD/SCID-Mäusen (1mm-Maßstab in Fotografien) sowie Bestimmung der CSC-Frequenz über ELDA. In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p<0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).

Folglich konnten kolorektale CSCs aus heterogenen Gesamtpopulationen von Primär-Tumorzelllinien gewonnen werden und in Versuche im Hinblick auf *cancer stemness* eingesetzt werden.

Um die *cancer stemness* der isolierten kolorektalen CSCs zu untersuchen, wurden die Goldstandards *in vitro* Sphäroidbildung und *in vivo* Tumorigenität bestimmt. Dazu wurde zuerst die *in vitro* Ausformung von Sphäroiden in ALDH⁺-Zellen im Vergleich zu ALDH⁻-Zellen analysiert und hierbei die CSC-Frequenz mittels *Extreme Limiting Dilution Analysis* bestimmt. Es zeigte sich, dass ALDH⁺-Zellen signifikant mehr Sphäroide ausbildeten, woraus sich eine signifikant höhere CSC-Frequenz bestimmen lies (**ABB. 6-E**). Weiterhin wurde die Tumorigenität der ALDH⁺ Zellfraktion in immundefizienten Mäusen untersucht und die CSC-Frequenz anhand *Extreme Limiting Dilution Analysis* bestimmt. Hierzu konnte die Versuchstierzahl minimiert werden, da der Zusammenhang von kolorektalen ALDH⁺-CSCs und Tumorigenität bereits bekannt ist (Huang et al., 2009) und die Tumorigenität der Primär-Tumorzelllinien bereits durch die Versuche zur biologischen Heterogenität nachgewiesen wurde. Die CSC-Frequenz wurde deshalb nur in coCSC-AS3 bestimmt. Es wuchsen signifikant mehr Tumore in ALDH⁺-CSCs im Vergleich zu ALDH⁻ Zellen aus, wodurch sich eine signifikant höhere CSC-Frequenz in ALDH⁺ errechnete. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Steigerung des Tumorgewichts bei ALDH⁺ Zellen (**ABB. 6-F**). Dadurch konnte die *cancer stemness* der sortierten kolorektalen CSCs durch die Goldstandards Tumorigenität und Sphäroidbildung bestätigt werden.

Zusammenfassend wurden vier kolorektale Primär-Tumorzelllinien direkt aus Kolonkarzinomgewebe etabliert und charakterisiert. Diese Primär-Tumorzelllinien waren durch ihre *in vivo* und *in vitro* Heterogenität mit anderen Arbeiten vergleichbar. Dabei gelang es, kolorektale CSCs im FACS anzureichern und deren *cancer stemness* anhand mehrerer Standards (Expressionsanalyse, Sphäroidbildung und Tumorigenität) zu belegen.

3.1.2 Funktionsverlust von BMI1 in humanen kolorektalen Primär-Tumorzelllinien

Um die *cancer stemness* in Abhängigkeit von BMI1 zu untersuchen, wurde in angereicherten CSCs aus coCSC-AS3 und coCSC-AS4 die BMI1-Expression durch RNAi ausgeschaltet. Beide Primär-Tumorzelllinien exprimierten BMI1 und waren somit für

einen BMI1-Knockdown geeignet (**ABB. 7-A**). Um die BMI1-Expression in coCSC-AS3 und coCSC-AS4 auszuschalten, wurden BMI1-spezifische oder eGFP-spezifische (Kontrolle) shRNA-Konstrukte eingesetzt. Dazu wurde eine Transduktion mit infektiösen, lentiviralen Partikeln durchgeführt. Durch eine anschließende kurze Puromycin-Selektion wurde eine Mischung aus unterschiedlichen Zellklonen (siehe ALDH-Sortierung unter 3.1.1) mit variablem BMI1-Knockdown generiert, sogenannte Bulk-Kulturen. Die RNA-Expression von BMI1 wurde mittels RT-qPCR analysiert und zudem als Surrogat für die Proteinmenge eingesetzt (siehe 3.2.1). Es wurde ein signifikanter BMI1-Verlust in coCSC-AS3 und coCSC-AS4 Bulk-Kulturen erzielt (**ABB. 7-B**). Um einem genetischen Drift und dem plastischen Verhalten von CSC-Populationen entgegenzuwirken, wurden mehrere Aliquote dieser Bulk-Kulturen

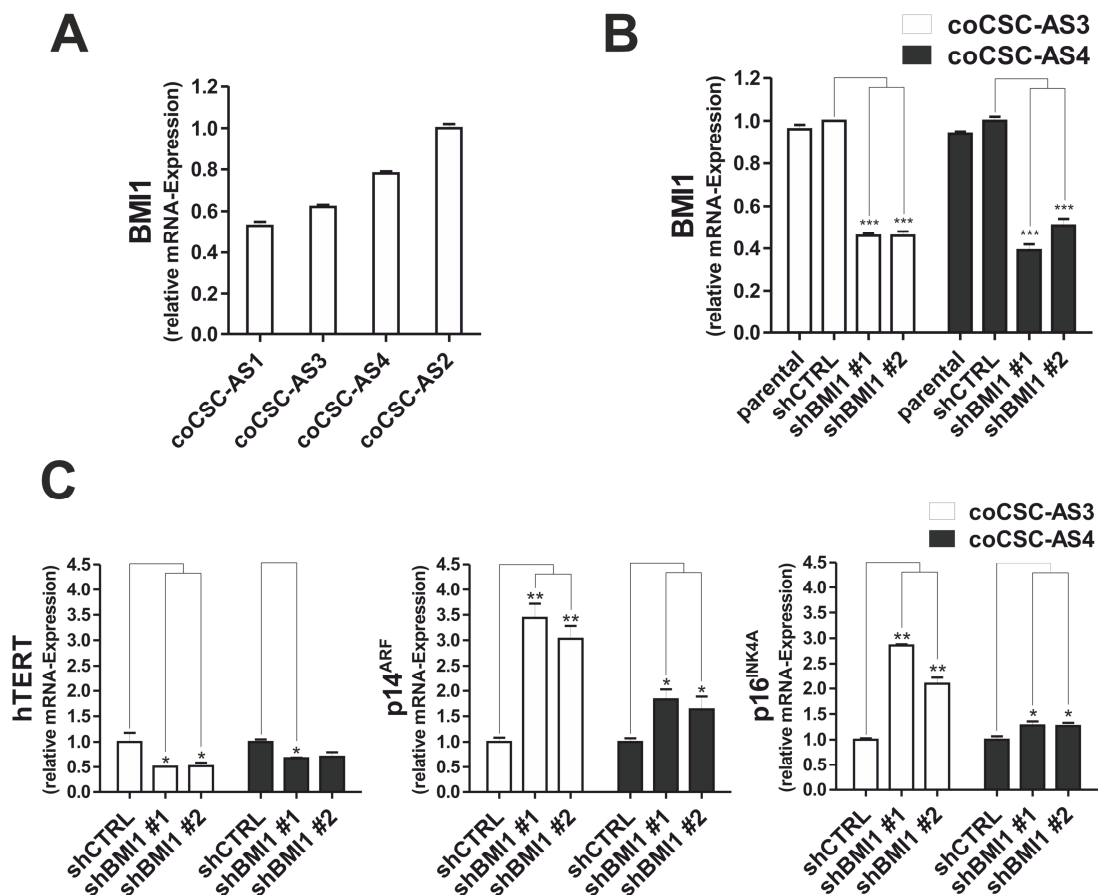


ABBILDUNG 7: FUNKTIONSVERLUST VON BMI1 IN HUMANEN KOLOREKTALEN PRIMÄR-TUMORZELLINIEN (A) Relative mRNA-Expression von BMI1 in den vier etablierten Primär-Tumorzelllinien coCSC-AS1 bis coCSC-AS4 (n=3) (B) mRNA-Expression von BMI1 in Primär-Tumorzelllinien bei einem BMI1-Knockdown (n=3) (C) Regulation der mRNA-Expression von hTERT (Abnahme), p14^{ARF} (Anstieg) und p16^{INK4A} (Anstieg) in Primär-Tumorzelllinien bei einem BMI1-Knockdown (n=3). In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p<0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).

eingefroren. Der BMI1-Knockdown konnte über mindestens drei Monate stabil nachgewiesen werden. Allerdings wurden die kultivierten Primär-Tumorzelllinien wegen der CSC-Plastizität nach spätestens acht Wochen (durch eingefrorene Aliquote) ersetzt.

Um den Verlust der BMI1-Aktivität bei einem BMI1-Knockdown in Primär-Tumorzelllinien nachzuweisen, wurden die RNA-Expressionen von hTERT, p14^{ARF} und p16^{INK4A} mittels RT-qPCR untersucht. Dabei reguliert BMI1 bekanntermaßen hTERT hoch (Dimri et al., 2002) sowie p14^{ARF} und p16^{INK4A} herunter (Kim et al., 2004; Fan et al., 2008). Es zeigte sich, dass der BMI1-Knockdown eine signifikant niedrigere hTERT Expression sowie höhere p14^{ARF} und p16^{INK4A} Expressionen verursachte (**ABB. 7-C**). Folglich führte der BMI1-Knockdown zu einem Funktionsverlust von BMI1 in den kolorektalen Primär-Tumorzelllinien coCSC-AS3 und coCSC-AS4.

3.1.3 BMI1 korreliert mit dem ‘Cancer Stem Cell’-Phänotyp in der kolorektalen Tumorphierarchie

Kolorektale CSCs bilden die Spitze der Tumorphierarchie und erzeugen durch ihre Selbsterhaltung und Differenzierungskapazität die histologische Heterogenität in den Krebszellpopulationen. Um die Differenzierungskapazität der kolorektalen CSCs in den Primär-Tumorzelllinien zu untersuchen, wurden diese zu SDAC-Kulturen ausdifferenziert (Todaro et al., 2007). Dafür wurden die als Suspensionszellen kultivierten Primär-Tumorzelllinien so lange adhärennten Kulturbedingungen ausgesetzt, bis sich eine Differenzierung einstellte. Nach etwa zwei bis drei Wochen zeigte sich eine zellmorphologische Differenzierung. Diese war an dem spindelförmigen Phänotyp der differenzierten SDACs, im Vergleich zu dem kugelförmigen Phänotyp der undifferenzierten CSCs, zu erkennen (**ABB. 8-A**). Weiterhin wurde die Differenzierung der SDACs durch die RNA-Expression der kolorektalen Differenzierungsmarker CDX2, KRT7 und KRT20 mittels RT-qPCR bestätigt. Es zeigte sich, dass SDACs im Vergleich zu den parentalen Primär-Tumorzelllinien die Differenzierungsmarker stärker exprimierten (**ABB. 8-B**). Zugleich wurden diese Differenzierungsmarker in Relation zu BMI1 gesetzt. Somit konnte die Differenzierungskapazität der Primär-Tumorzelllinien demonstriert werden und BMI1 mit dem undifferenzierten Phänotyp der parentalen Primär-Tumorzelllinien assoziiert werden. Zudem ermöglichten

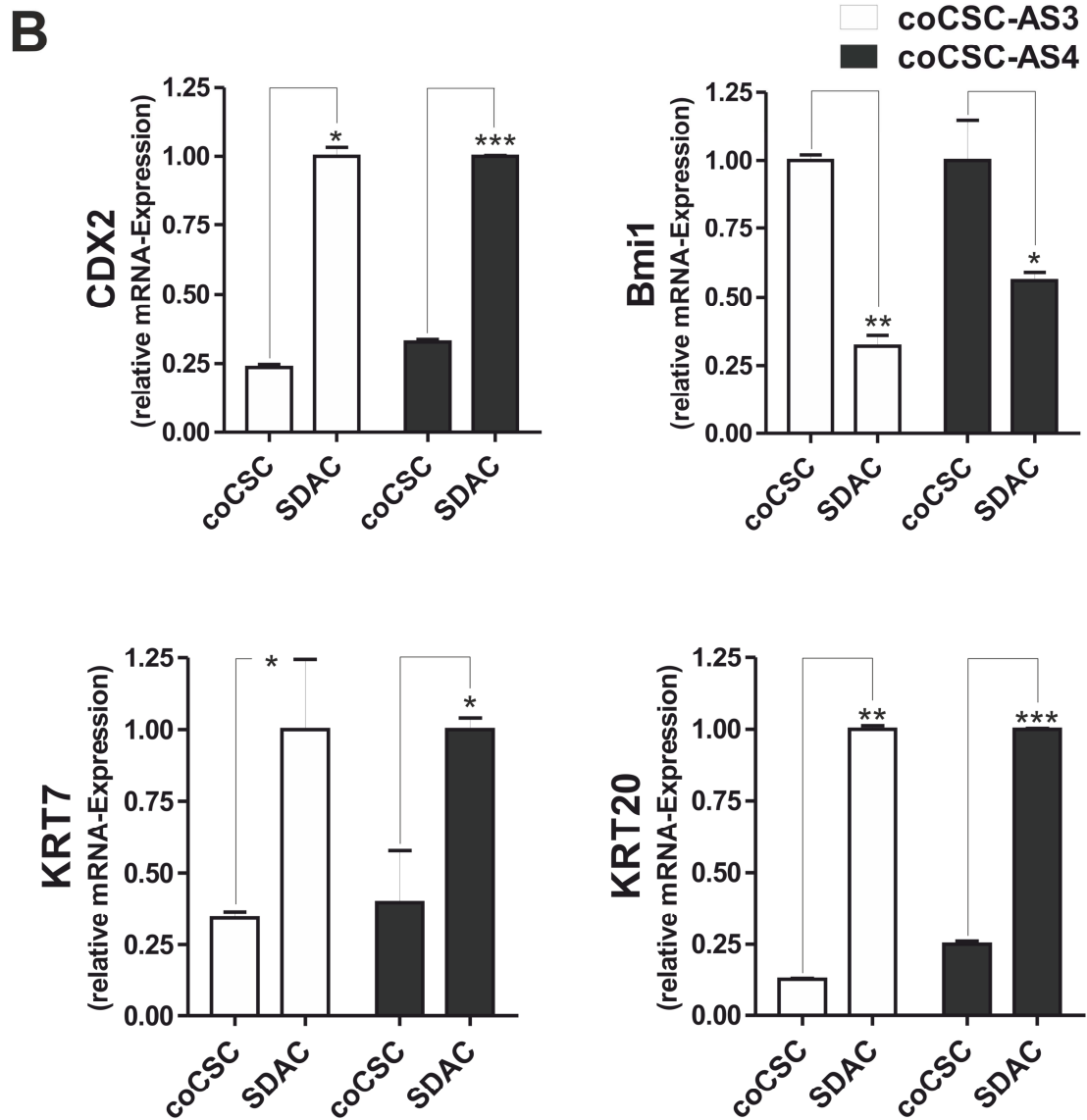
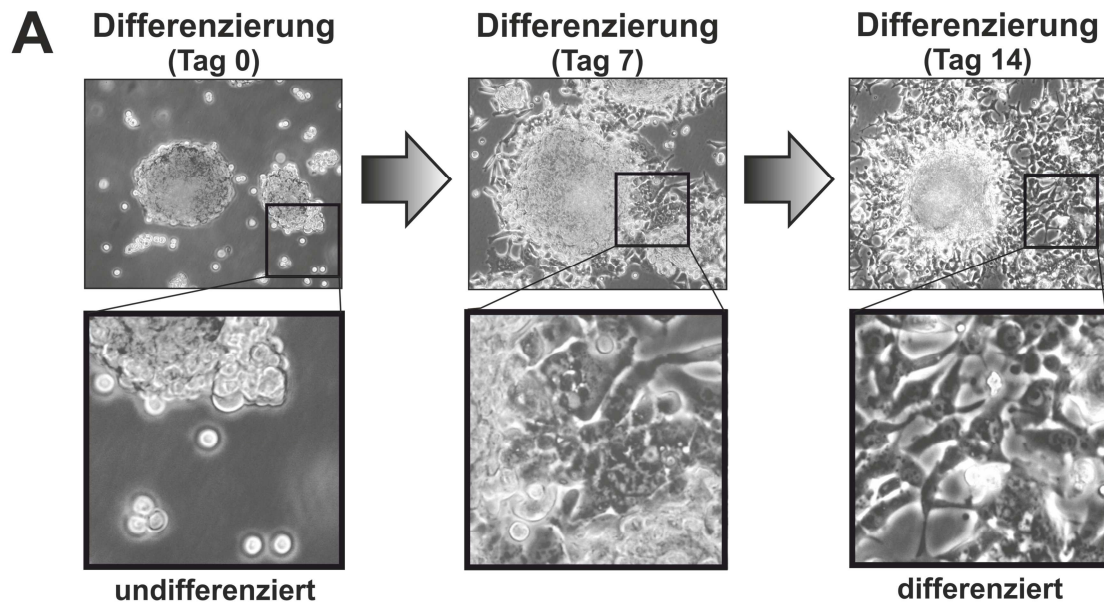


ABBILDUNG 8: BMI1 KORRELIERT MIT DEM CSC-PHÄNOTYP IN DER KOLOREKTALEN TUMORHIERARCHIE (A) Schema zur Ausdifferenzierung von kolorektalen, Primär-Tumorzelllinien zu adhärenenten SDACs (*spheroid derived adherent cell*) **(B)** mRNA-Expression (n=3) der kolorektalen Differenzierungsmarker CDX2, KRT7 und KRT20 sowie von BMI1 in parentalen undifferenzierten coCSC-AS3 und coCSC-AS4 und korrespondierenden SDACs (Differenzierungszeitraum ≥ 14 Tage). In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

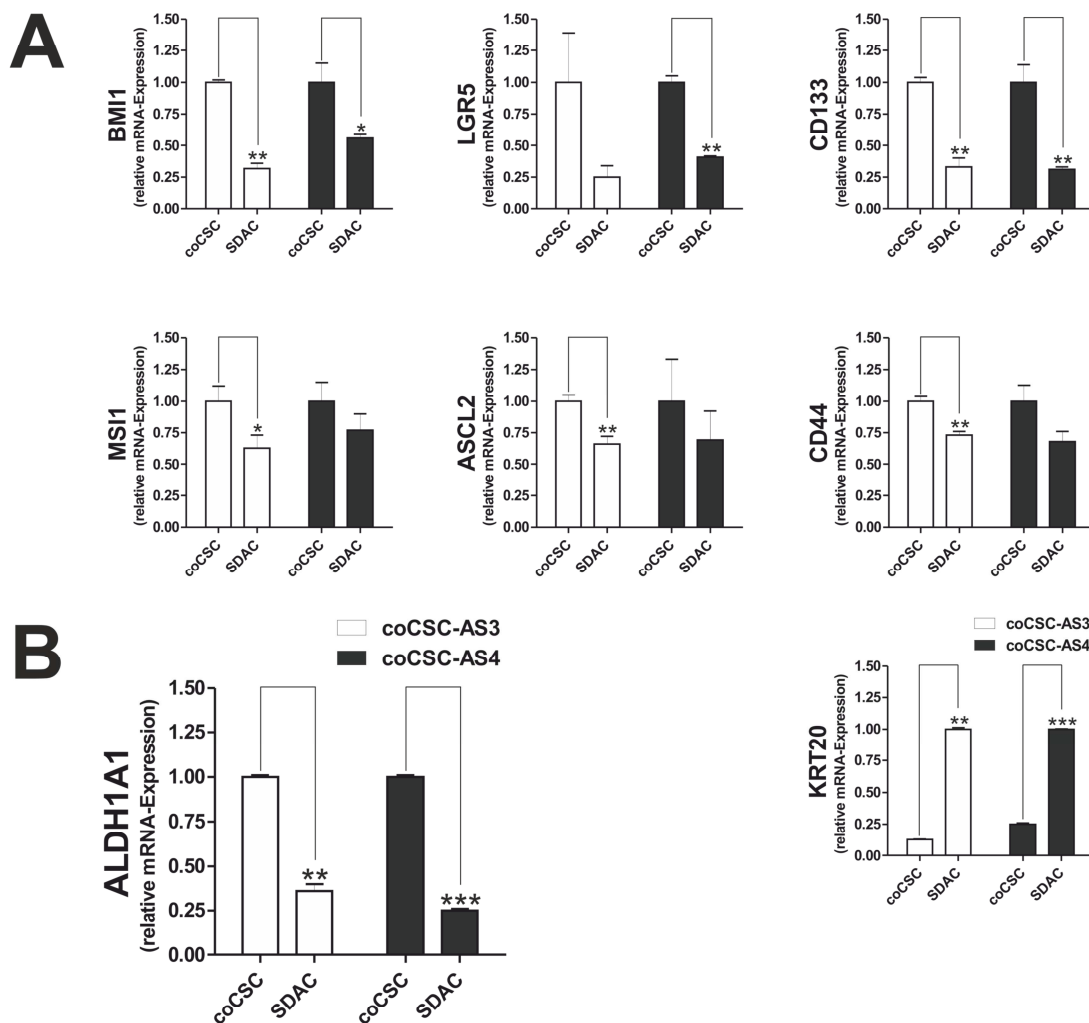
SDACs einen Vergleich zwischen differenziertem Phänotyp und CSC-Phänotyp in Untersuchungen zur *cancer stemness*.

3.1.4 BMI1 erhält den ‘Cancer Stem Cell’-Phänotyp in humanen kolorektalen Primär-Tumorzelllinien

Neben der Differenzierungskapazität, aus der alle Zelltypen eines Tumors hervorgehen, ist die Selbsterhaltung für CSC-Populationen maßgeblich. Deshalb wurde zunächst die Auswirkung der BMI1-Expression auf die relative Größe von CSC-Populationen analysiert. Dazu wurden SDACs (niedrige BMI1-Expression) und deren parentalen Primär-Tumorzelllinien (starke BMI1-Expression) eingesetzt und die RNA-Expressionen mittels RT-qPCR, bezüglich der ISC-Marker BMI1, MSI1, LGR5 und ASCL2 sowie der CSC-Marker CD44 und CD133 und des Differenzierungsmarkers KRT20 bestimmt. Hierbei wurde die Expressionsstärke der einzelnen Stammzellmarker als ein Indikator für die relative Anzahl der CSCs genutzt. Durch den Einsatz von mehreren Markern aus unterschiedlichen Bereichen konnte das Ergebnis verifiziert werden. Es zeigte sich eine niedrigere Expression der Stammzellmarker und eine höhere Expression des Differenzierungsmarkers in SDACs der Zelllinien coCSC-AS3 und coCSC-AS4 (**ABB. 9-A**). Folglich korrelierte wie erwartet die BMI1-Expression mit der relativen Populationsgröße an CSCs. Um die BMI1-Expression mit der relativen Größe der CSC-Populationen in funktionellen Versuchen zu korrelieren, wurde die Aktivität des Wnt-Signalweges in kolorektalen CSCs genutzt (Vermeulen et al., 2010). Dazu wurden TOP-flash Experimente durchgeführt. Es zeigte sich, dass in SDACs eine signifikant kleinere CSC-Zellfraktion mit aktivem Wnt-Signalweg vorhanden war als in den parentalen Primär-Tumorzelllinien (**ABB. 9-E**). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die absoluten prozentualen Größen der CSC-Populationen bestimmt. Hierzu wurden ALDH⁺-Zellen markiert und anschließend mit Hilfe von grüner Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie analysiert. Dabei entsprechen ALDH⁺-Zellen den CSCs in kolorektalen Zelllinien (Huang et al., 2009). Es zeigte sich zum einen, dass in SDACs signifikant weniger ALDH⁺-CSCs waren als in den parentalen Primär-

Tumorzelllinien (**ABB. 9-D**), was im Einklang mit einer niedrigeren mRNA-Expression von ALDH1A1 stand (**ABB. 9-B**). Zum anderen ergab die ALDH-Analyse einen prozentualen CSC-Anteil von etwa 70% in beiden parental Primär-Tumorzelllinien (**ABB. 9-C**). Zusammenfassend wurde in SDACs eine geringere Anzahl an kolorektalen CSCs nachgewiesen, die mit einer niedrigeren BMI1-Expression korrelierte.

Um weiterführend die Rolle von BMI1 in der Aufrechterhaltung von kolorektalen CSC-Populationen zu untersuchen, wurden die Auswirkungen eines BMI1-Knockdowns analog analysiert. Dafür wurden zuerst die RNA-Expressionen der Biomarker BMI1, MSI1, LGR5, ASCL2, CD44, CD133 und KRT20 mittels RT-qPCR bestimmt. Es zeigte sich, dass der BMI1-Knockdown zu einer niedrigeren Expression der Stammzellmarker und zu einer höheren Expression des Differenzierungsmarkers in coCSC-AS3 und coCSC-AS4 führte (**ABB. 10-A**). Folglich bewirkte der BMI1-



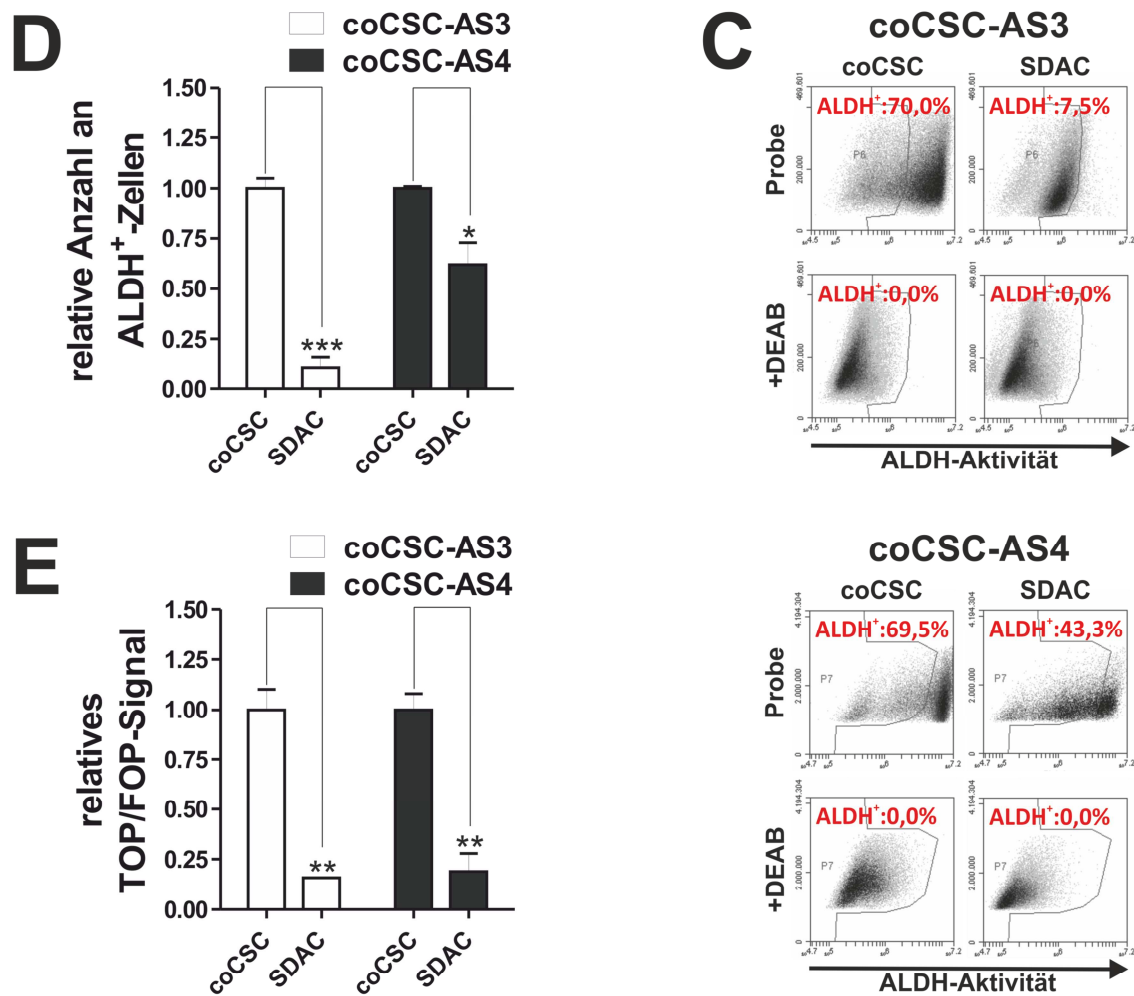
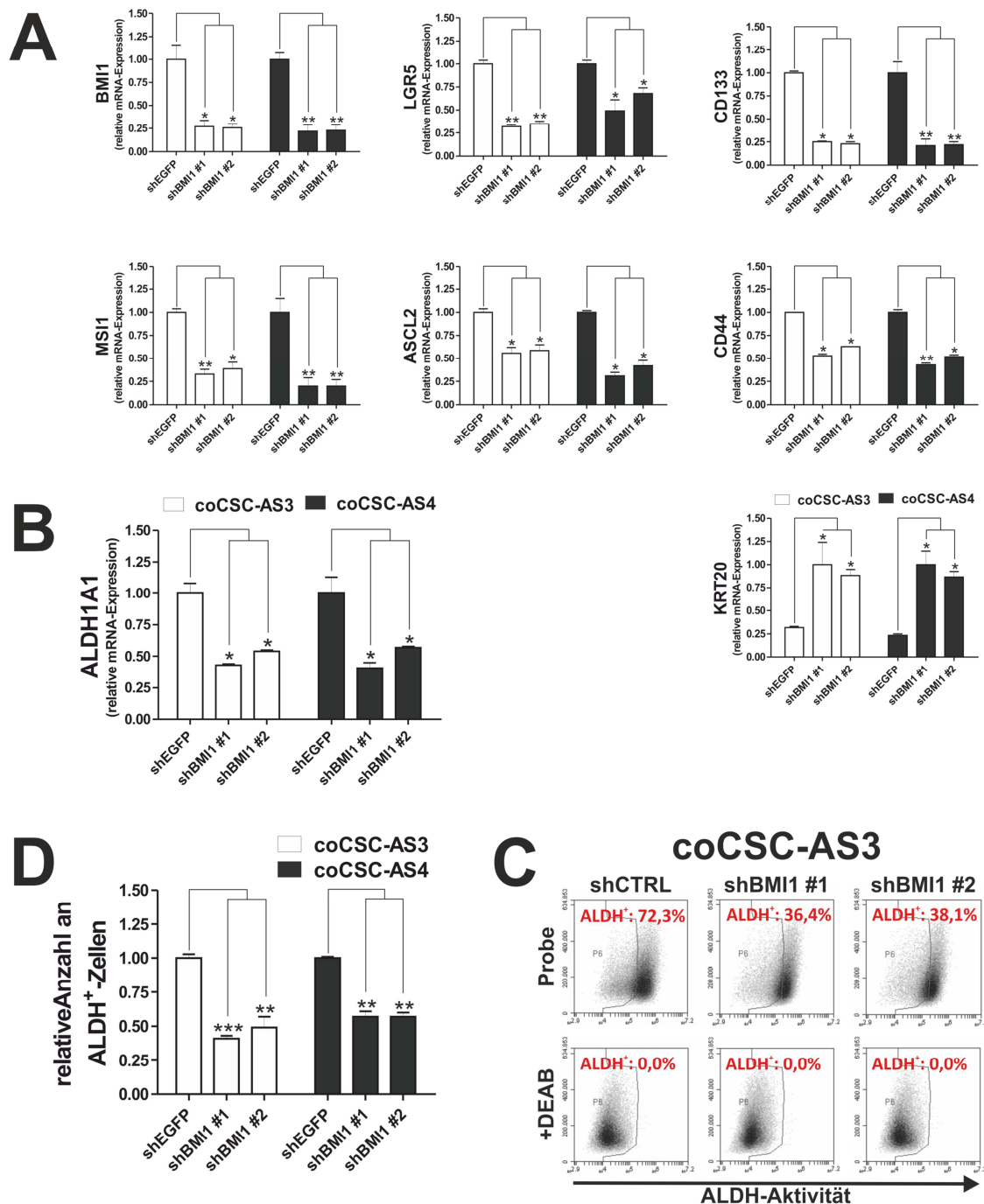


ABBILDUNG 9: BMI1 KORRELIERT MIT DEM KOLOREKTALEN CSC-PHÄNOTYP IN PRIMÄR-TUMORZELLINIEN (A) mRNA-Expression der Stammzellmarker BMI1, MSI1, LGR5, ASCL2, CD44 und CD133 sowie des Differenzierungsmarkers KRT20 in SDACs und deren parentalen Primär-Tumorzelllinien coCSC-AS3 und coCSC-AS4 und **(B)** mRNA-Expression von ALDH1A1 (n=3) **(C)** Prozentualer Anteil der ALDH-aktiven kolorektalen CSCs (ALDH⁺) an der Gesamtpopulation von SDACs und deren parentalen Primär-Tumorzelllinien, sowie **(D)** relativer Anteil an ALDH⁺-CSCs, in der Durchflusszytometrie (n=4) **(E)** Relatives TOP/FOP-Signal in SDACs und deren parentalen Primär-Tumorzelllinien (n=4). In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p<0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).

Knockdown bei gleichbleibender CSC-Anzahl eine Reduktion dieser Markerexpressionen oder bei gleichbleibenden Markerexpressionen eine Reduktion der CSC-Populationsgröße. Um auszuschließen, dass es sich bei diesem Ergebnis ausschließlich um eine Modulation des Expressionsprofil handelt wurden die Populationsgrößen weiter untersucht. Die Reduktion der relativen CSC-Populationsgrößen wurden in TOP-flash Experimenten verifiziert. Es zeigte sich durch den Verlust von BMI1 eine signifikant kleinere CSC-Population mit aktivem Wnt-Signalweg (**ABB. 10-E**). Zuletzt wurden die absoluten, prozentualen CSC-Anteile der Gesamtpopulation in

der Durchflusszytometrie mit Hilfe der ALDH-Aktivität analysiert. Es zeigte sich, dass in Primär-Tumorzelllinien bei einem BMI1-Knockdown signifikant weniger ALDH⁺-Zellen bestimmt wurden (**ABB. 10-D**), was im Einklang mit einer niedrigeren ALDH-Expression steht (**ABB. 10-B**). Dabei ergab sich erwartungsgemäß ein durchschnittlicher CSC-Anteil von circa 70% in beiden Primär-Tumorzelllinien (**ABB. 10-C**). Zusammenfassend resultierte aus dem BMI1-Knockdown in kolorektalen primären CSC-Kulturen eine kleinere CSC-Population. Dies lässt auf eine Beeinträchtigung der Selbsterhaltung oder Plastizität der CSCs schließen.



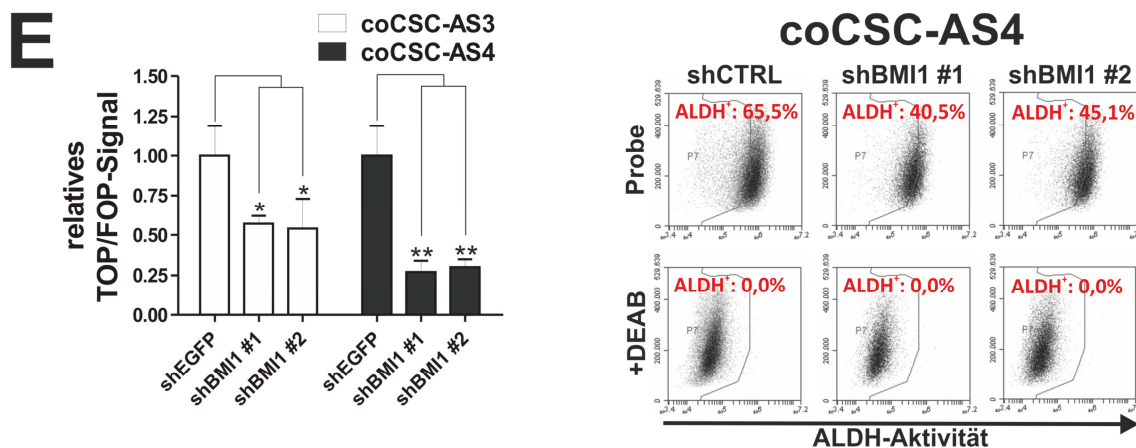


ABBILDUNG 10: BMI1 ERHÄLT DEN CSC-PHÄNOTYP IN HUMANEN KOLOREKTALEN PRIMÄR-TUMORZELLINIEN (A) mRNA-Expression der Stammzellmarker BMI1, MSI1, LGR5, ASCL2, CD44 und CD133 sowie des Differenzierungsmarkers KRT20 in coCSC-AS3 und coCSC-AS4 bei einem BMI1-Knockdown und **(B)** mRNA-Expression von ALDH1A1 (n=3). **(C)** Prozentualer Anteil der ALDH-aktiven kolorektalen CSCs (ALDH⁺) an der Gesamtpopulation von Primär-Tumorzelllinien bei einem BMI1-Knockdown, sowie **(D)** relativer Anteil an ALDH⁺-CSCs, in der Durchflusszytometrie (n=4). **(E)** Relatives TOP/FOP-Signal in Primär-Tumorzelllinien bei einem BMI1-Knockdown (n=4). In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p<0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).

3.1.5 BMI1 steigert die Sphäroidausformung in humanen kolorektalen Primär-Tumorzelllinien

Bei der *in vitro* Ausformung von Sphäroiden handelt es sich um eine essentielle *cancer stemness* Eigenschaft, die zugleich ein Standard in der Bestimmung von CSCs ist. Dazu wurde untersucht, ob BMI1 die *cancer stemness* in kolorektalen CSCs beeinflusst. Um einen Zusammenhang der BMI1-Expression mit der Kapazität zur Sphäroidbildung zu untersuchen, wurde die *in vitro* Sphäroidbildung in SDACs und deren parentalen Primär-Tumorzelllinien untersucht. Dabei wurde die CSC-Frequenz mittels *Extreme Limiting Dilution Analysis* bestimmt. Es zeigte sich, dass signifikant weniger Sphäroide in SDACs aus coCSC-AS3 und coCSC-AS4 gebildet wurden (**ABB. 11-A**). Zudem wurde eine signifikant kleinere CSC-Frequenz für SDACs bestimmt. Folglich konnte BMI1 mit der *in vitro* Sphäroidbildung kolorektaler CSCs assoziiert werden.

Um die Rolle von BMI1 in der *in vitro* Sphäroidbildung kolorektaler CSCs zu bestimmen, wurde der BMI1-Knockdown in Primär-Tumorzelllinien untersucht. Dabei wurde die CSC-Frequenz durch *Extreme Limiting Dilution Analysis* analysiert. Es zeigte sich eine signifikant geringere Sphäroidanzahl bei einem Knockdown von BMI1 in coCSC-AS3 und coCSC-AS4. In Einklang damit errechnete sich eine signifi-

kant geringere CSC-Frequenz (**ABB. 11-B**). Folglich vergrößerte BMI1 die Fähigkeit zur *in vitro* Ausformung von Sphäroiden in humanen, kolorektalen Primär-Tumorzelllinien.

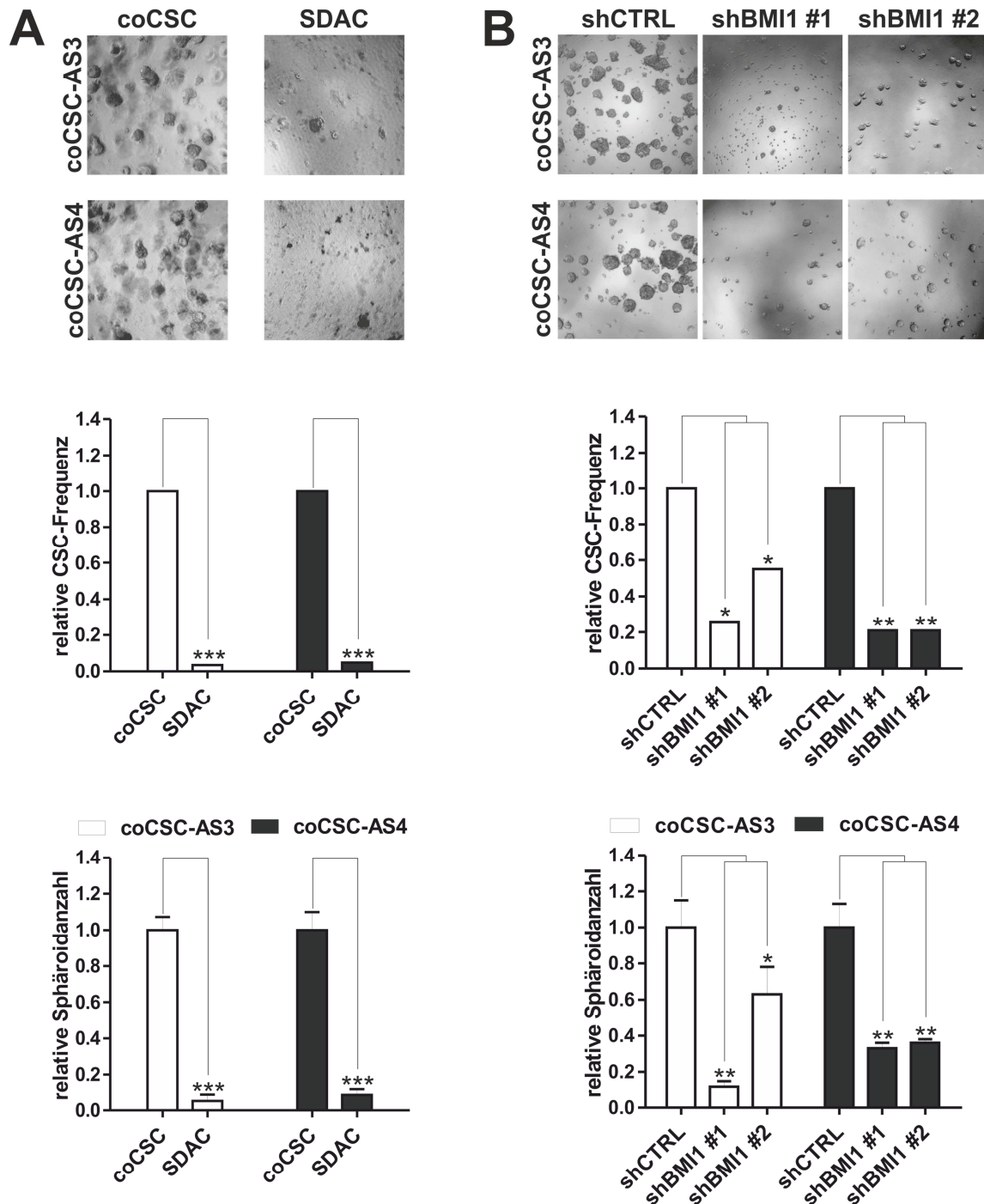
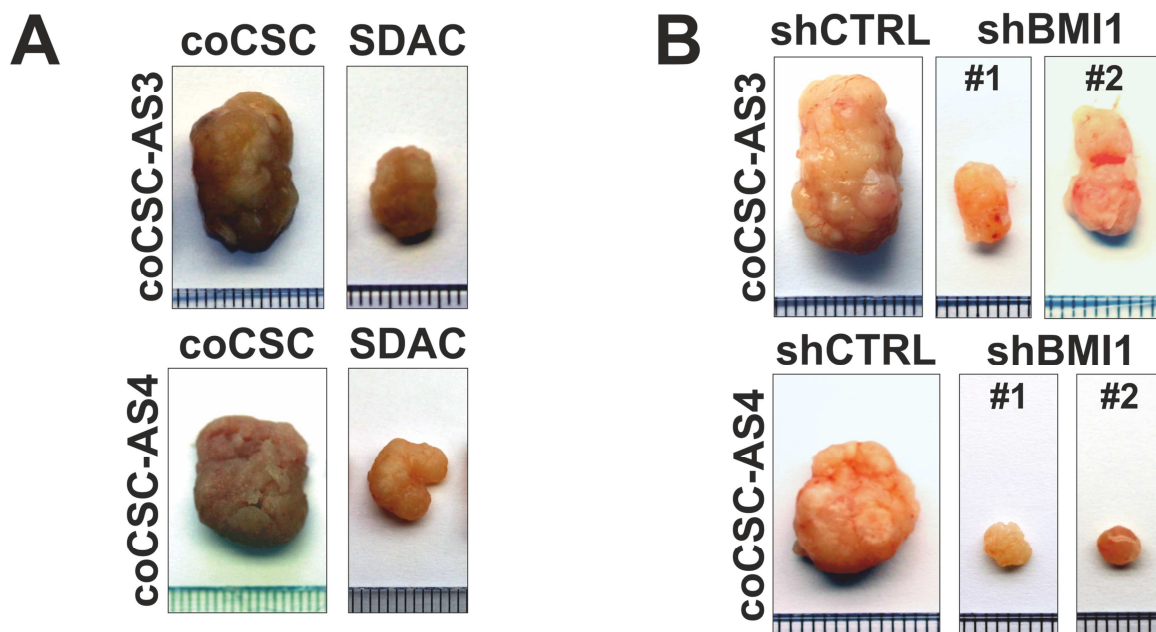


ABBILDUNG 11: BMI1 STEIGERT DIE SPHÄROIDBILDUNG IN HUMANEN KOLOREKTALEN PRIMÄR-TUMORZELLINIEN (A) Sphäroidbildung in SDACs (geringe BMI1-Expression) und deren parental Primär-Tumorzelllinien (hohe BMI1-Expression), Bestimmung der relativen CSC-Frequenz mittels *Extreme Limiting Dilution Analysis* (ELDA) (n=4). **(B)** Sphäroidbildung in Primär-Tumorzelllinien bei einem BMI1-Knockdown. Bestimmung der relativen CSC-Frequenz mittels ELDA (n=4). In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p<0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).

3.1.6 BMI1 steigert die Tumorigenität in humanen kolorektalen Primär-Tumorzelllinien

Da Tumorinitiation und Tumorstadium über CSCs verlaufen, handelt es sich hierbei um eine entscheidende *cancer stemness* Eigenschaft. Deshalb ist die Tumorigenität auch ein Goldstandard in der Untersuchung von CSCs. Um einen Zusammenhang der BMI1-Expression mit der Tumorigenität zu analysieren, wurden SDACs und deren parentalen Primär-Tumorzelllinien subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert. Dabei wurde die CSC-Frequenz durch *Extreme Limiting Dilution Analysis* bestimmt. Es wuchsen signifikant weniger Tumore in SDACs der coCSC-AS3 und coCSC-AS4 aus. Dadurch errechnete sich eine signifikant geringere CSC-Frequenz in SDACs (**ABB. 12-A**). Weiterhin zeigte sich eine signifikante Reduktion im Tumorgewicht bei SDACs. Daher konnte die Tumorigenität kolorektaler CSCs mit der BMI1-Expression in Korrelation gebracht werden.

Um die Rolle von BMI1 in der Tumorigenität kolorektaler CSCs zu untersuchen, wurden Bulk-Kulturen der Primär-Tumorzelllinien subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert. Es zeigte sich, dass durch einen BMI1-Knockdown in coCSC-AS3 und coCSC-AS4 weniger Tumore entstanden. Daraus errechnete sich eine signifikant niedrigere CSC-Frequenz (**ABB. 12-B**). Weiterhin bewirkte der BMI1-Knockdown ein signifikant geringeres Tumorgewicht. Folglich steigerte BMI1 sowohl die tumorinitiierenden als auch die tumorfördernden Fähigkeiten der kolorektalen CSCs. Zusammenfassend wurde anhand der Goldstandards Tumorigenität und Sphäroidbildung



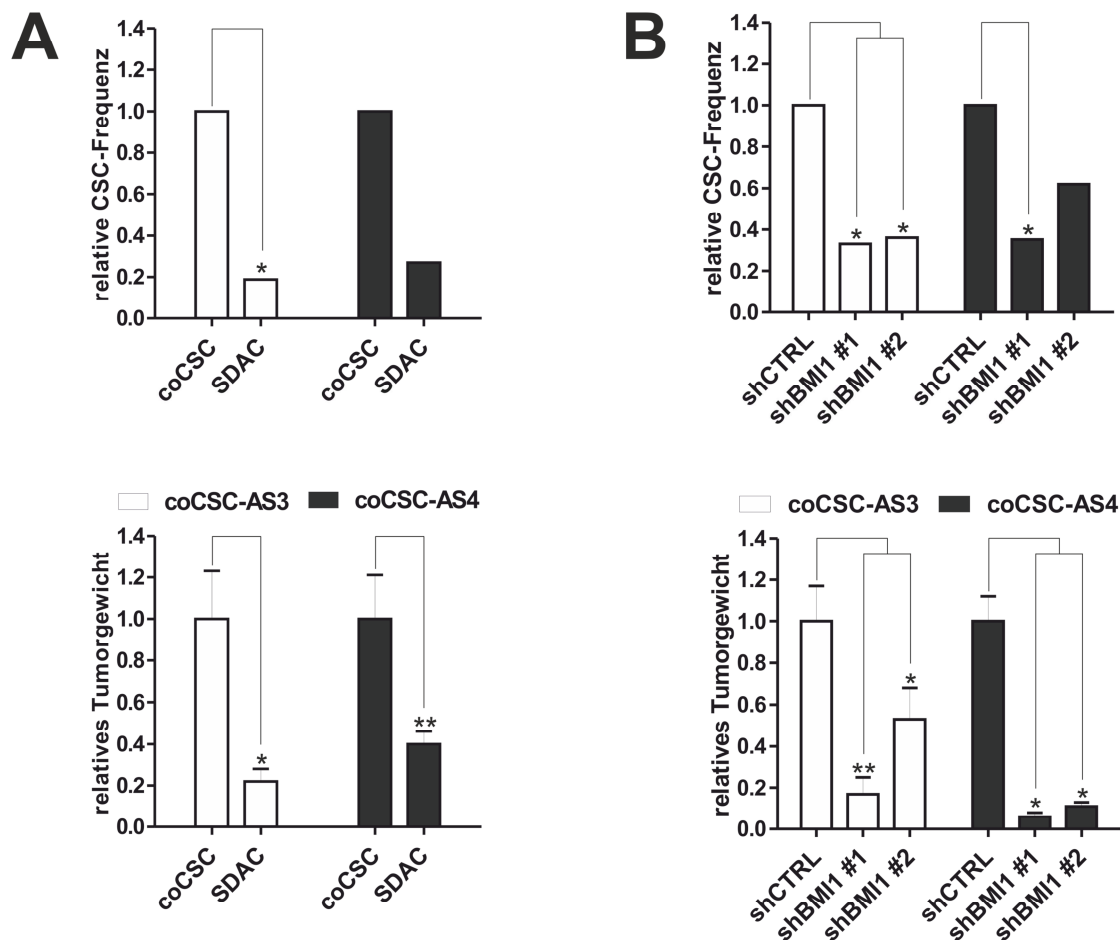


ABBILDUNG 12: BMI1 STEIGT DIE TUMORIGENITÄT IN HUMANEN KOLOREKTALEN PRIMÄR-TUMORZELLINIEN (A) Tumorigenität von SDACs (niedrige BMI1-Expression) und deren parental Primär-Tumorzelllinien (hohe BMI1-Expression) in immundefizienten NOD/SCID-Mäusen (n=6), Bestimmung der CSC-Frequenz mittels *Extreme Limiting Dilution Analysis* (ELDA) **(B)** Tumorigenität von Primär-Tumorzelllinien bei einem BMI1-Knockdown in NOD/SCID-Mäusen, Bestimmung der CSC-Frequenz mittels ELDA. In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt (1mm-Maßstab in den Fotografien). Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

(siehe 3.1.5) die essentielle Rolle von BMI1 für kolorektale CSCs und deren *cancer stemness* belegt.

3.2 BMI1 steigert progressive kolorektale Tumoreigenschaften wie ‘Therapieresistenz’, ‘EMT’ und ‘Metastasierung’

3.2.1 Funktionsverlust von BMI1 in humanen kolorektalen Tumorzelllinien

Die essentielle Bedeutung von BMI1 für kolorektale CSCs und deren *cancer stemness* impliziert eine zentrale Rolle in klinisch-relevanten malignen Eigenschaften, wie

zum Beispiel dem Therapieversagen oder der Metastasierung. Um diese Eigenschaften in Abhängigkeit von BMI1 zu untersuchen, wurde die BMI1-Expression in Tumorzelllinien mittels RNAi ausgeschaltet. Für einen Knockdown wurden zunächst kolorektale Tumorzelllinien mit einer BMI1-Expression gesucht. Hierfür wurden die zwölf humanen kolorektalen Tumorzelllinien CACO2, COLO320, DLD1, HTC15, HTC116, LS174T, RKO, SW403, SW480, SW620, SW1222 und T84 auf ihre BMI1-Expression mittels RT-qPCR und Westernbot analysiert. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Tumorzelllinien BMI1 als RNA (**ABB. 13-A**) und als Protein (**ABB. 13-B**) exprimierten. Da die relative RNA-Menge zudem mit der Proteinmenge stark korrelierte, konnte in den weiteren Versuchen die RNA-Expression als Surrogat für die Proteinmenge verwendet werden. Insgesamt konnte in allen untersuchten kolorektalen Tumorzelllinien ein BMI1-Knockdown durchgeführt werden. Daher wurden weitere Entscheidungskriterien für die Auswahl der Tumorzelllinien hinzugezogen, vergleichbar zu den Entscheidungskriterien der Primär-Tumorzelllinien (siehe 3.1.1). Demnach wurden COLO320 (MSS/CIMP⁻) sowie DLD1 (MSI-H/CIMP⁺) ausgewählt (**TAB. 4**). Weitere Aspekte für die Unterscheidung kolorektaler Karzinome können aktivierende Mutationen sein. Diese treten in der Mehrheit aller Fälle von Kolonkarzinomen im Wnt-Signalweg auf (Bienz and Clevers, 2000). Hierbei sind vor allem die Moleküle CTNNB1 oder APC als Komponenten des Wnt-Signalweges betroffen. Eine

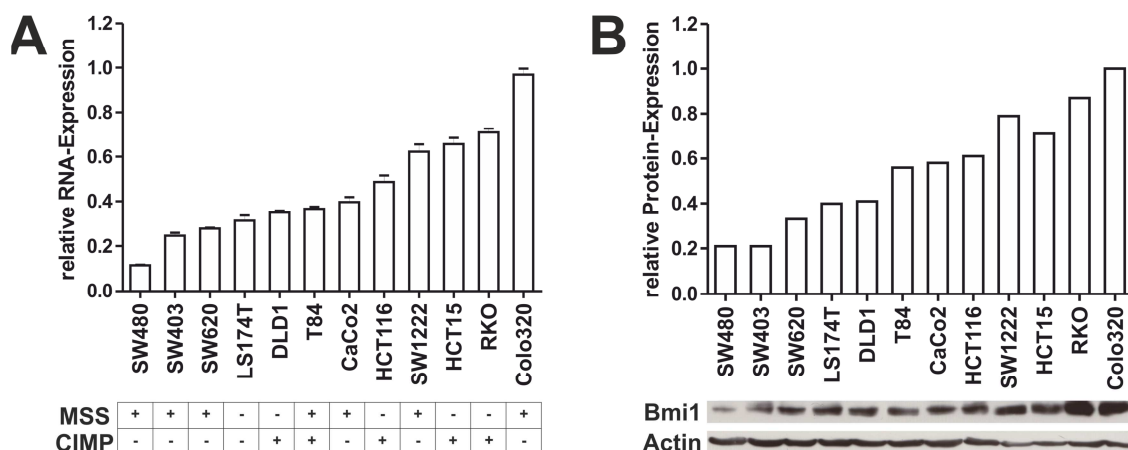
TABELLE 4: CHARAKTERISTIKA VON ZWÖLF LANGZEITKULTIVIERTEN HUMANEN KOLOREKTALEN TUMORZELLINIEN (nach (Bracht et al., 2010; Suter et al., 2003))

CRC-Zelllinie	Ploidiegrad	MSS-Status	CIMP-Status	Aktivierende Mutation
COLO320	aneuploid	MSS	CIMP ⁻	Wnt-Signalweg
Caco2	aneuploid	MSS	CIMP ⁻	Wnt-Signalweg
SW1222	aneuploid	MSS	CIMP ⁻	Wnt-Signalweg
SW403	aneuploid	MSS	CIMP ⁻	Wnt-Signalweg
SW480	aneuploid	MSS	CIMP ⁻	Wnt-Signalweg
SW620	aneuploid	MSS	CIMP ⁻	Wnt-Signalweg
T84	diploid	MSS	CIMP ⁺	Wnt-Signalweg
DLD1	diploid	MSI-H	CIMP ⁺	Wnt-Signalweg
HCT15	diploid	MSI-H	CIMP ⁺	Wnt-Signalweg
HCT116	diploid	MSI-H	CIMP ⁺	Wnt-Signalweg
LS174T	diploid	MSI-H	CIMP ⁻	Wnt-Signalweg
RKO	diploid	MSI-H	CIMP ⁺	CDX2-Gen

Ausnahme ist die kolorektale Tumorzelllinie RKO, die keine aktivierende Mutation im Wnt-Signalweg sondern im CDX2-Gen trägt (Dang et al., 2001). Aufgrund dieses Alleinstellungsmerkmals wurde die Tumorzelllinie RKO in Auswahl der Tumorzelllinien einbezogen.

Um die vorhandene BMI1-Expression in COLO320, DLD1 und RKO Tumorzelllinien auszuschalten, wurden BMI1-spezifische oder eGFP-spezifische shRNA-Konstrukte (siehe 3.1.2) eingesetzt. Dazu wurde eine Transduktion mit infektiösen, lentiviralen Partikeln durchgeführt. Mittels anschließender kurzer Puromycin- Selektion wurde eine Mischung aus Zellklonen mit variablem BMI1-Knockdown generiert, sogenannte Bulk-Kulturen. Deren BMI1-Expression wurde mittels RT-qPCR und Westernblot analysiert. Es zeigte sich ein signifikanter BMI1-Verlust innerhalb der COLO320, DLD1 und RKO Bulk-Kulturen (**ABB. 13-C und ABB. 13-D**). Um einen genetischen Drift durch Langzeitkultivierung vorzubeugen, wurden mehrere Aliquote dieser analysierten Bulk-Kulturen eingefroren. Zusätzlich wurde der BMI1-Knockdown in den kultivierten Bulk-Kulturen verfolgt. Er konnte über mindestens sechs Monate stabil nachgewiesen werden. Um Veränderungen in den Bulk-Kulturen zweifellos auszuschließen, wurden die kultivierten Tumorzelllinien bereits nach ungefähr acht Wochen (durch aufgetaute Aliquote) ersetzt.

Um einen Funktionsverlust von BMI1 in Tumorzelllinien bei einem BMI1-Knockdown nachzuweisen, wurden die RNA-Expressionen von hTERT, p14^{ARF} und p16^{INK4A} mittels RT-qPCR untersucht. Dabei reguliert BMI1 bekanntermaßen hTERT hoch (Dimri et al., 2002) sowie p14^{ARF} und p16^{INK4A} herunter (Kim et al., 2004; Fan et al., 2008). Es zeigte sich, dass der BMI1-Knockdown in COLO320, DLD1 und RKO



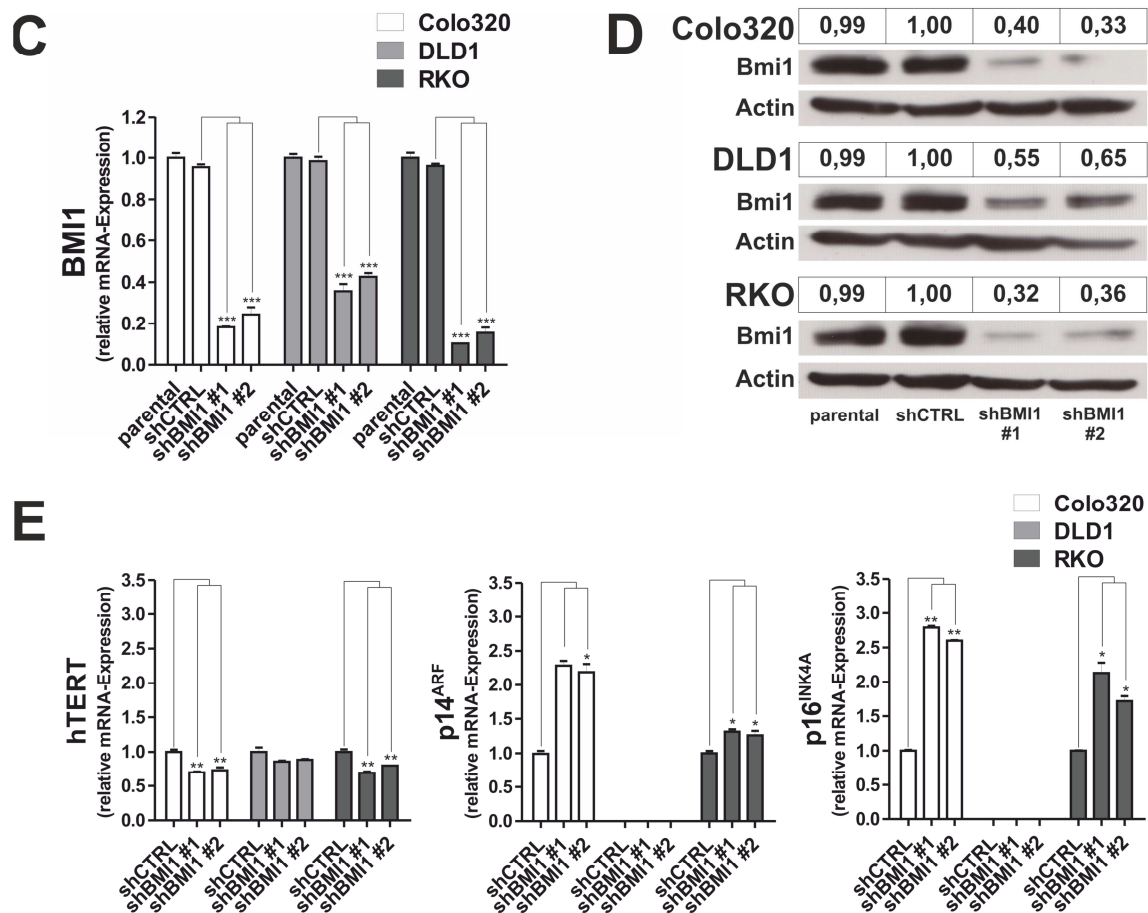
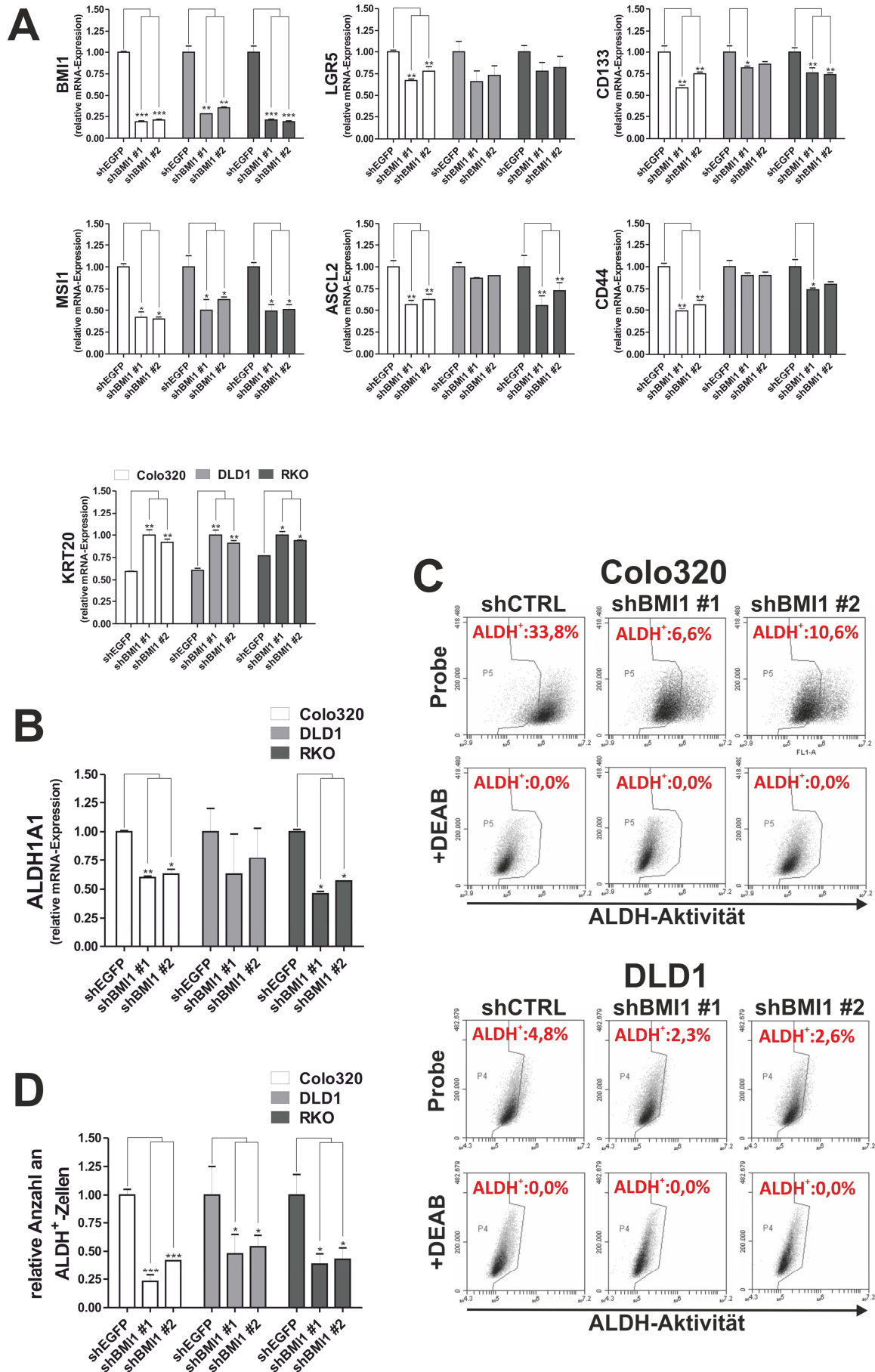


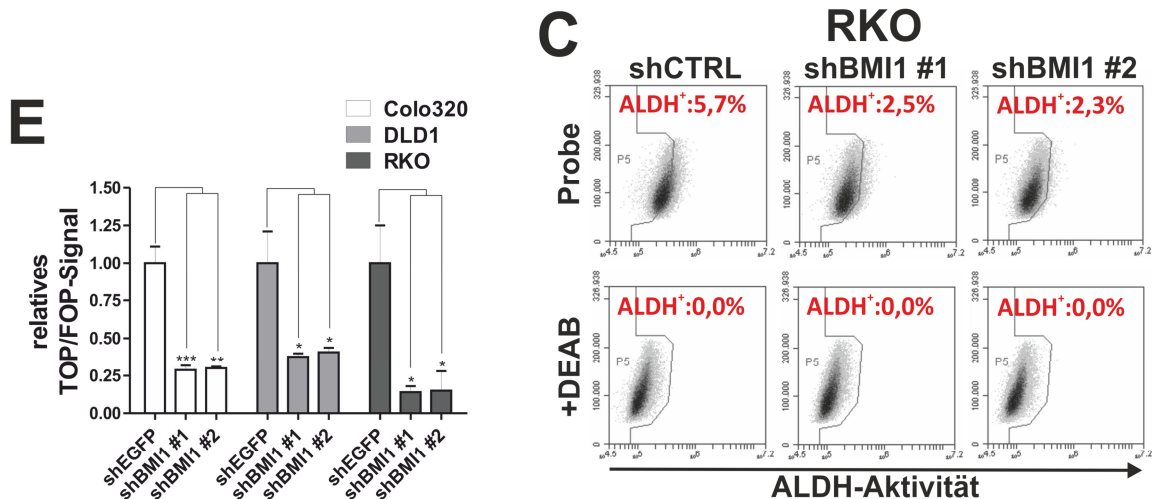
ABBILDUNG 13: FUNKTIONSVERLUST VON BMI1 IN HUMANEN KOLOREKTALEN TUMORZELLINIEN (A) Relative mRNA-Expression von BMI1 in zwölf humanen kolorektalen Tumorzelllinien (n=3) und (B) relative Proteinmenge an BMI1 (C) Mittels RNAi ausgeschaltete RNA-Expression von BMI1 in COLO320, DLD1 und RKO (n=3) (D) BMI1-Proteinmenge in COLO320, DLD1 und RKO mit RNA-Knockdown (E) mRNA-Expression (n=3) von hTERT (Abnahme), p14^{ARF} (Zunahme) und p16^{INK4A} (Zunahme) in Tumorzelllinien mit BMI1-Knockdown (in DLD1 keine messbare p14^{ARF} und p16^{INK4A} Expression). In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p< 0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).

eine signifikant niedrigere Expression von hTERT sowie höhere Expressionen von p14^{ARF} und p16^{INK4A} bewirkte (ABB. 13-E). Wie zu erwarten exprimierte die Tumorzelllinie DLD1 kein p14^{ARF} und p16^{INK4A} aufgrund einer möglichen Inaktivierung der Promoterregionen durch Methylierung (Kim et al., 2005; Zheng et al., 2000). Zusammenfassend konnte somit die BMI1-Expression mittels RNAi in humanen kolorektalen COLO320, DLD1 und RKO ausgeschaltet werden, was zu einem BMI1-Funktionsverlust führte.

3.2.2 BMI1 erhält den ‘Cancer Stem Cell’-Phänotyp in humanen kolorektalen Tumorzelllinien

Da sich in kolorektalen Primär-Tumorzelllinien die CSC-Populationen durch den Knockdown von BMI1 verkleinerten, wurde der Vergleich zu langzeitkultivierten Tumorzelllinien gezogen und analog zu 3.1.4 durchgeführt. Dafür wurde zuerst die Auswirkung eines BMI1-Knockdowns auf die relative Größe von CSC-Populationen analysiert. Hierfür wurde die Expressionsstärke von Biomarkern als Indikator für die Anzahl der CSCs genutzt und die RNA-Expression der ISC-Marker BMI1, MSI1, LGR5 und ASCL2 sowie der CSC-Marker CD44 und CD133 und des Differenzierungsmarker KRT20 mittels RT-qPCR bestimmt. Es zeigte sich bei einem BMI1-Knockdown in COLO320, DLD1 und RKO eine reduzierte Expression der Stammzellmarker und eine erhöhte Expression des Differenzierungsmarkers (**ABB. 14-A**). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass ein BMI1-Knockdown ebenfalls kleinere CSC-Populationen in langzeitkultivierten Tumorzelllinien bewirkte. Um diese Reduktion der relativen Größe kolorektaler CSC-Populationen funktionell zu validieren, wurde die erhöhte Aktivität des Wnt-Signalweges in CSCs verwendet (Vermeulen et al., 2010). Hierzu wurde in TOP-flash Experimenten (Molenaar et al., 1996) die TCF4-Reporteraktivität in den kolorektalen Bulk-Kulturen gemessen. Es ergaben sich signifikant kleinere Zellpopulationen mit aktivem Wnt-Signalweg bei einem BMI1-Knockdown (**ABB. 14-E**), welche auf die relative CSC-Populationsgröße schließen lassen. Darauf aufbauend wurde die absolute prozentuale Größe der CSC-Population bestimmt. Dazu wurden die erhöhten ALDH-Expressionen in kolorektalen CSCs genutzt, indem ALDH-aktive kolorektale CSCs markiert und anschließend in der Durchflusszytometrie anhand ihrer grünen Fluoreszenz analysiert wurden (Huang et al., 2009). Es zeigte sich zunächst, dass signifikant weniger ALDH⁺-CSCs in COLO320, DLD1 und RKO Bulk-Kulturen nachgewiesen werden konnten (**ABB. 14-D**). In Einklang mit diesem Ergebnis wurde eine verringerte ALDH-Expression in den Bulk-Kulturen nachgewiesen (**ABB. 14-B**). Zudem konnte der prozentuale CSC-Anteil in kolorektalen Zellpopulationen abgeschätzt werden. In langzeitkultivierten DLD1 und RKO betrug der CSC-Anteil annähernd 5%, in COLO320 etwa 35% (**ABB. 14-C**). Folglich resultierte aus dem Knockdown von BMI1 eine kleinere CSC-Population in humanen kolorektalen COLO320, DLD1 und RKO. Zusammenfassend führte der BMI1-Verlust zu einer Beeinträchtigung der Selbsterhaltung oder Plastizität





**ABBILDUNG 14: BMI1 ERHÄLT DEN ‘CANCER STEM CELL’-PHÄNOTYPS IN HUMANEN KOLOREKTAL-
 LEN TUMORZELLINIEN (A)** Expressionsanalyse (mRNA) der ISC-Marker BMI1, MSI1, LGR5 und
 ASCL2 sowie der CSC-Marker CD44 und CD133 und des Differenzierungsmarkers KRT20 in
 humanen, kolorektalen COLO320, DLD1 und RKO Bulk-Kulturen und **(B)** mRNA-Expression
 des Stammzellmarkers ALDH1A1 (n=3). **(C)** Prozentualer Anteil der ALDH-aktiven kolorekta-
 len CSCs (ALDH⁺) bezogen auf die Gesamtpopulation sowie **(D)** relativer Anteil an ALDH⁺-
 CSCs , in der Durchflusszytometrie (n=4). **(E)** Relative CTNNB1-Aktivität gemessen an der
 TOP/FOP-Luciferaseaktivität (n=4). In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse
 gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p< 0,05; ** : p<0,01;
 *** : p<0,001).

kolorektaler CSC-Populationen, sowohl in langzeitkultivierten Tumorzelllinien als auch in Primär-Tumorzelllinien (vergleiche 3.1.4). Dabei wurde eine ungefähr zwei- bis vierzehnfach größere CSC-Population in Primär-Tumorzelllinien im Vergleich zu langzeitkultivierten Tumorzelllinien gemessen, wodurch die Auswirkungen eines BMI1-Verlustes in Primär-Tumorzelllinien stärker ausfielen.

3.2.3 BMI1 reguliert Proliferation und Apoptose in humanen kolorektalen Tumorzelllinien

Mit Hilfe der Bulk-Kulturen wurde nun die Bedeutung von BMI1 für die *hallmarks of cancer* ‘Proliferation’ und ‘Apoptose’(Hanahan and Weinberg, 2011) untersucht. Um den Gesamteffekt von BMI1 auf diese beiden *hallmarks of cancer* zu analysieren, wurden die Wachstumskinetiken bestimmt. Es zeigte sich, dass der BMI1-Knockdown zu einer signifikanten Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit in humanen kolorektalen COLO320, DLD1 und RKO Populationen führte (**ABB. 15-A**). Um den Effekt von BMI1 auf ‘Proliferation’ und ‘Apoptose’ getrennt betrachten zu können, wurden die Hauptphasen des Zellzyklus mittels des zellulären DNA-Gehaltes (PI-Färbung) in der Durchflusszytometrie untersucht. Es zeigte sich, dass

der BMI1-Knockdown sowohl einen signifikant kleineren sub-G1-Peak (Apoptose) als auch eine tendenzielle Vergrößerung der G1-Phase bei gleichbleibender S-Phase (Proliferation) bewirkte (**ABB. 15-B**). Letzteres entspricht einem G1-Arrest, der erwartungsgemäß über die gesteigerte p14^{ARF} und p16^{INK4A} Expression vermittelt werden könnte (Fan et al., 2008). Folglich regulierte der BMI1-Knockdown sowohl

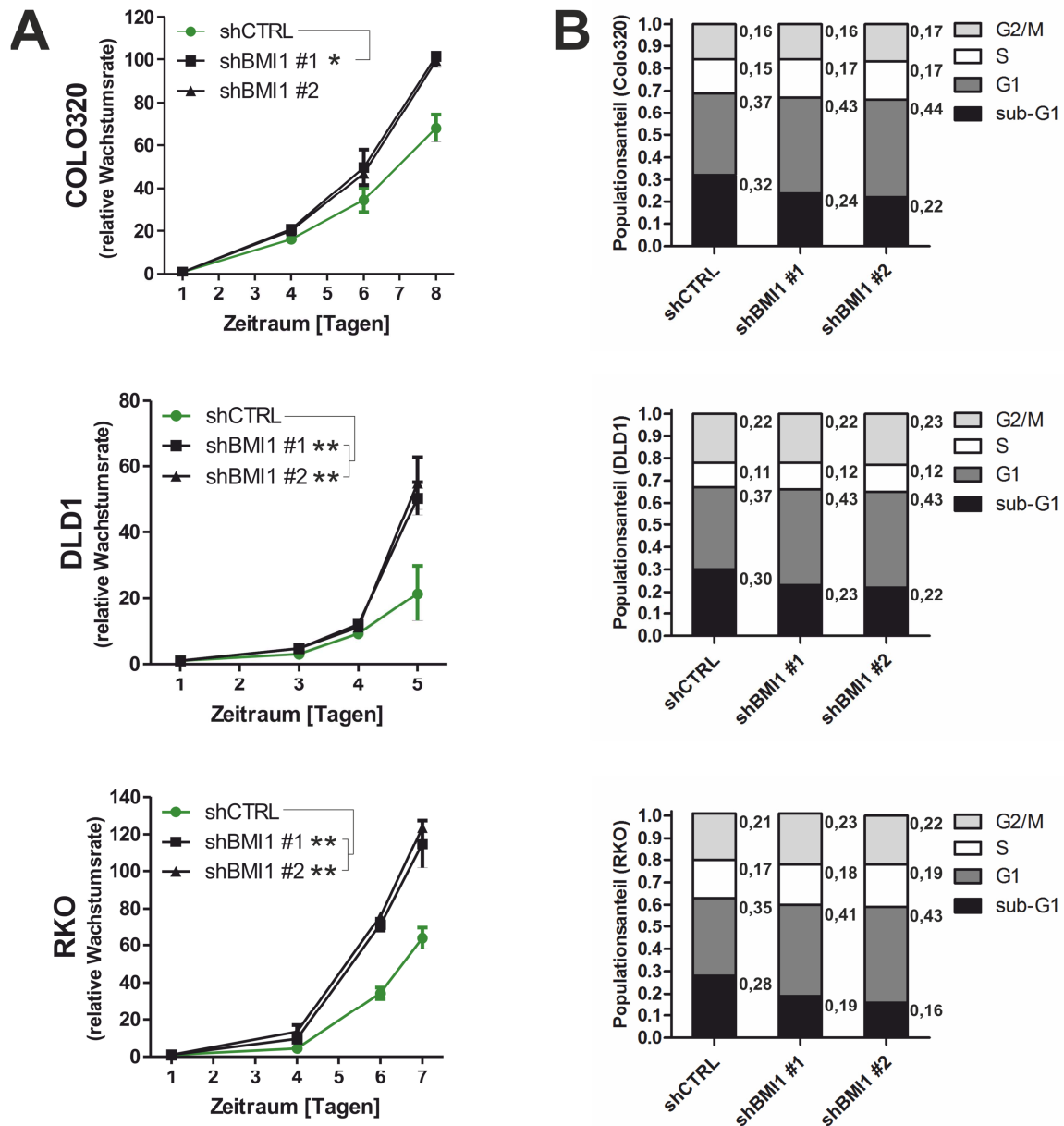
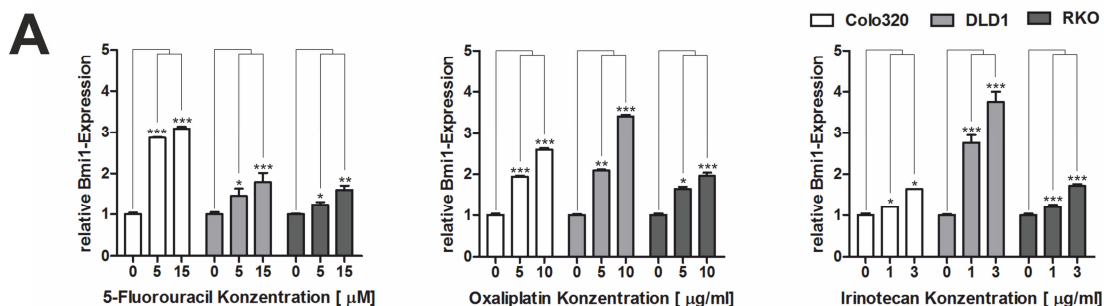


ABBILDUNG 15: BMI1 REGULIERT PROLIFERATION UND APOPTOSE IN HUMANEN KOLOREKTALEN TUMORZELLINIEN (A) Wachstumskinetiken bei BMI1-Knockdown in COLO320, DLD1 und RKO Tumorzelllinien **(B)** Analyse der Hauptphasen des Zellzyklus G1, S (Proliferation) und G2/M sowie sub-G1 (Apoptose) an den Endpunkten der Wachstumskinetiken (n=3), mittels PI-Färbung des zellulären DNA-Inhaltes. In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p< 0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).

‘Proliferation‘ als auch ‘Apoptose‘ im Zellzyklus kolorektaler COLO320, DLD1 und RKO Tumorzelllinien und führte in Kombination zu einer gesteigerten Wachstumsrate.

3.2.4 BMI1 steigert die Chemoresistenz gegenüber 5-Fluorouracil in humanen kolorektalen Tumorzelllinien

Cancer stemness kolorektaler CSCs ist mit Chemoresistenz gekoppelt, die maßgeblich für das Therapieversagen kolorektaler Karzinome ist. Um die Rolle von BMI1 in der Chemoresistenz kolorektaler Krebszellen zu untersuchen, wurden COLO320, DLD1 und RKO *in vitro* so lange entweder 5-FU oder Oxaliplatin oder Irinotecan ausgesetzt, bis daraus chemoresistentere Zellen resultierten. Dabei konnten bei DLD1 und RKO nach ungefähr 5-7 Tagen, bei COLO320 circa nach 10-14 Tagen Ergebnisse erzielt werden. Diese chemoresistenten Zellen wurden bezüglich ihrer BMI1-Expression mittels RT-qPCR mit den parental Tumorzelllinien verglichen. Es zeigte sich, dass COLO320, DLD1 und RKO Tumorzelllinien als Reaktion auf die Chemotherapeutika signifikant und dosisabhängig mehr BMI1 exprimierten (**ABB. 16-A**). Folglich konnte BMI1 mit chemoresistenten Zellen kolorektaler Tumorzelllinien assoziiert werden. Da 5-FU das meist verwendete Chemotherapeutikum in den S3-Leitlinien kolorektaler Karzinome ist (Edwards et al., 2012), wurde es in den folgenden Experimenten verwendet. Um die Rolle von BMI1 in der 5-FU-Resistenz kolorektaler CSCs zu untersuchen, wurde die Apoptose in Bulk-Kulturen während einer 5-FU Behandlung analysiert. Aufbauend auf den Ergebnissen zur Proliferation/Apoptose (vergleiche 3.2.3) wurden die Wachstumskinetiken sowie die Hauptphasen des Zellzyklus bestimmt. Es ergab sich, dass der Verlust von BMI1 während einer 5-FU Behandlung einerseits zu einer relativen Reduktion der Zellzahl führte (**ABB. 16-B**). Andererseits erhöhte sich der Anteil an apoptotischen Zellen (sub-G1 Peak) (**ABB. 16-**



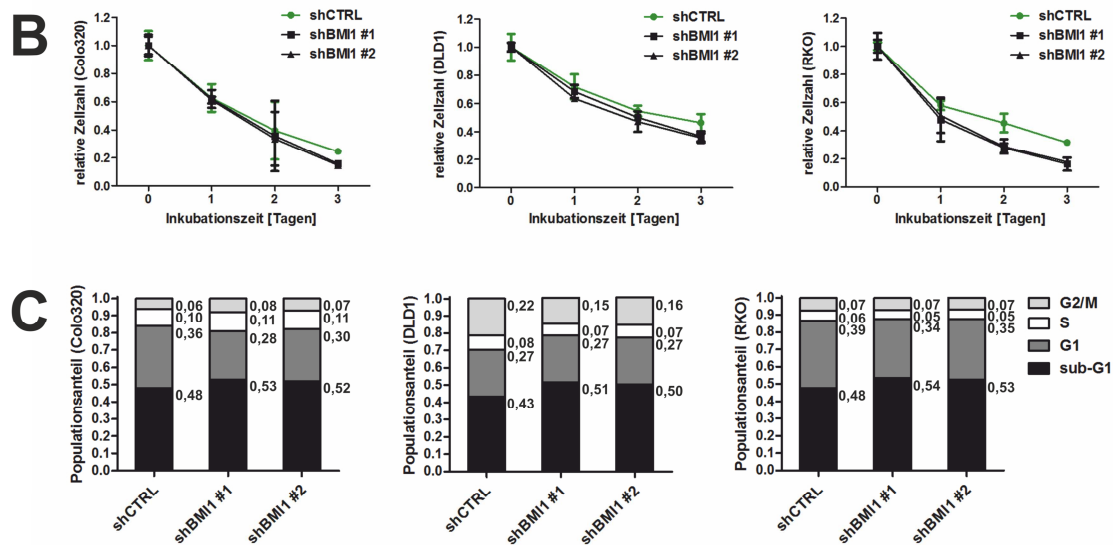


ABBILDUNG 16: BMI1 STEIGT DIE CHEMORESISTENZ GEGENÜBER 5-FU IN HUMANEN, KOLOREKTALEN TUMORZELLINIEN (A) mRNA-Expression von BMI1 in COLO320, DLD1 und RKO nach Behandlung mit entweder 5-Fluoruracil (5-FU), oder Oxaliplatin, oder Irinotecan (n=3). **(B)** Wachstumskinetiken von COLO320 Bulk-Kultur nach Zugabe von 400 μ M 5-FU, DLD1 Bulk-Kultur nach Zugabe von 150 μ M 5-FU und RKO Bulk-Kultur nach Zugabe von 50 μ M 5-FU und **(C)** Hauptphasen des Zellzyklus (G1, S und G2/M) sowie Anteil der apoptotischen Zellen (sub-G1) an den Endpunkten der 5-FU Behandlung (n=3). In den Darstellungen wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

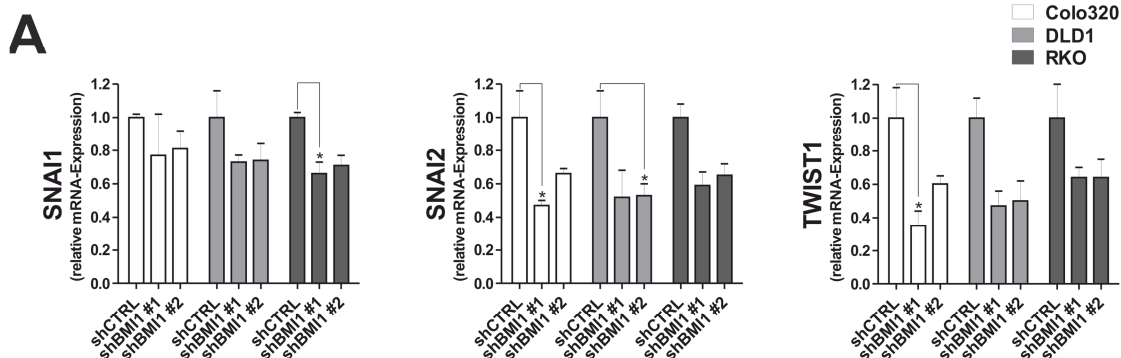
C). Somit wurden die kolorektalen Tumorzelllinien COLO320, DLD1 und RKO durch den BMI1-Knockdown chemosensitiver gegenüber 5-FU. Diese Ergebnisse wurden durch die unter 3.1.2 angestiegene Verdopplungsrate und durch den gesunkenen sub-G1-Peak bei einem BMI1-Knockdown unterstützt.

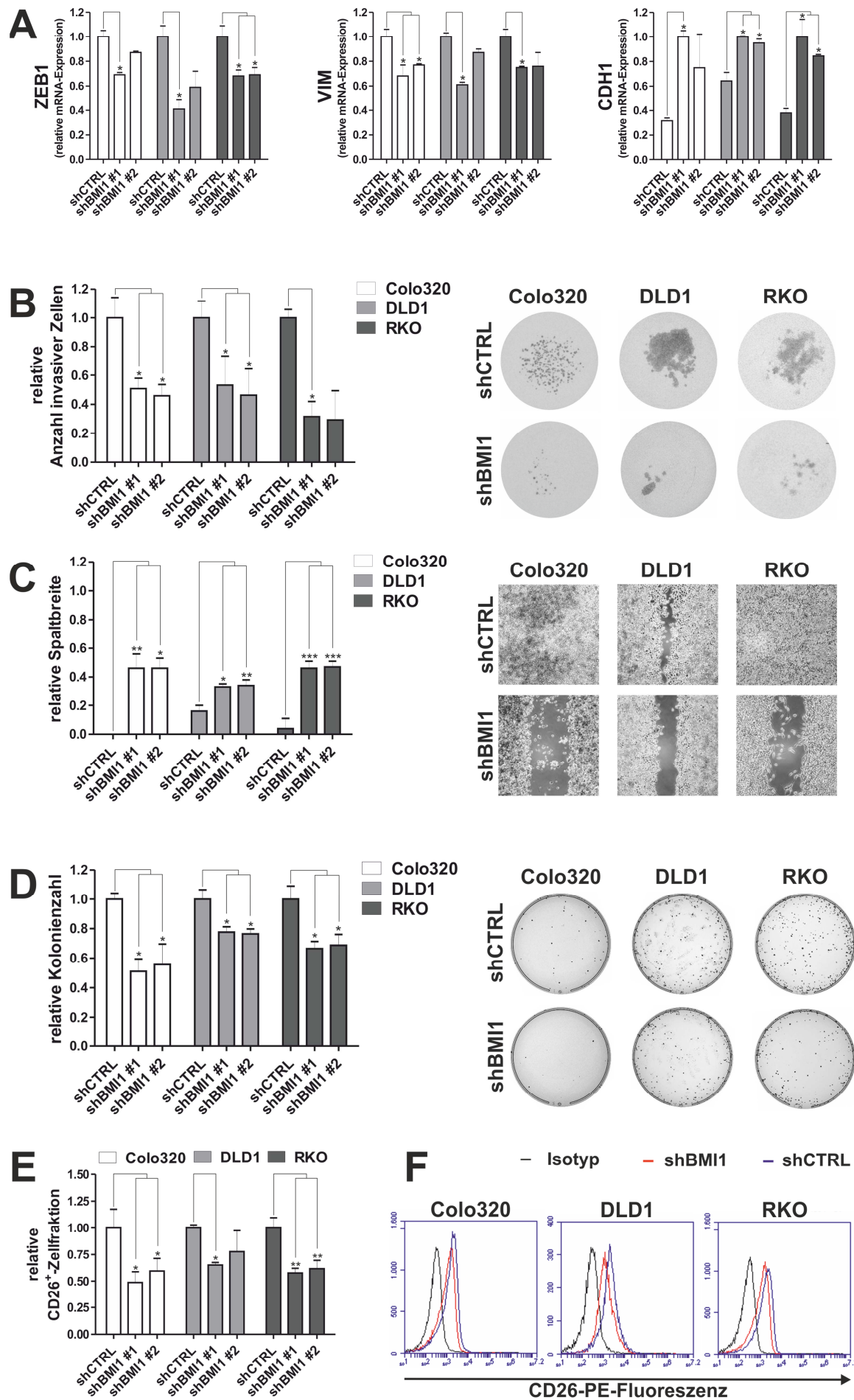
3.2.5 BMI1 steigert EMT und Metastasierungsfähigkeit in humanen kolorektalen Tumorzelllinien

Da über 90% aller durch Darmkrebs verursachten Todesfälle auf Metastasen zurückzuführen sind (Christofori, 2006), kommt dem *hallmark of cancer* 'Invasion und Metastasierung' für Darmkrebspatienten die zentrale Rolle zu. Dabei charakterisiert ein reaktiviertes embryonales Transdifferenzierungsprogramm, bekannt als EMT, die 'Invasion und Metastasierung' (Hanahan and Weinberg, 2011). Als Indikatoren für EMT wurden Expressionen von EMT-Biomarkern, Migrationsverhalten und Invasionsfähigkeit analysiert. Zuerst wurden Expressionsanalysen durchgeführt - erwartungsgemäß zeigte sich, dass ein BMI1-Knockdown in COLO320, DLD1 und RKO die Expression der EMT-assoziierten Gene SNAIL, SLUG, TWIST1, ZEB1 und VIM redu-

zierte, hingegen die des epithelial exprimierten Gen E-CADHERIN erhöhte (**ABB. 17-A**). Daraufhin wurden die Migration mittels Wundheilungsexperimenten und die damit verknüpfte Invasion in Transwellexperimenten analysiert. Es zeigte sich, dass der Verlust an BMI1 zu einer signifikanten Verringerung der Migrationsfähigkeit (**ABB. 17-B**) und Invasionsfähigkeit (**ABB. 17-C**) führte. Folglich wirkte der Verlust von BMI1 dem EMT-Programm entgegen und reduzierte funktionelle EMT-Eigenschaften wie Invasion und Migration.

Demnach sollte die Metastasierungsfähigkeit ebenfalls durch einen BMI1-Knockdown beeinträchtigt werden. Dazu wurden die In-vitro-Kolonisationsfähigkeit und die Metastasenentwicklung in immundefizienten Mäusen untersucht. Die Kolonisationsfähigkeit wurde mit Hilfe von Transformationsexperimenten in Methylzellulose bestimmt. Es wuchsen signifikant weniger Kolonien aus COLO320, DLD1 und RKO bei einem BMI1-Knockdown als in den Kontrollgruppen (**ABB. 17-D**). Zur Bestimmung der Metastasierungsfähigkeit wurden *Bioluminescence-imaging*-Experimente mit der kolorektalen Tumorzelllinie SW620 durchgeführt (Jackstadt et al., 2013). Dazu wurden Tumorzellen in die Schwanzvene von NOD/SCID-Mäusen injiziert und die Ausbildung von Lungenmetastasen bei einem Verlust an BMI1 mittels *in vivo imaging* analysiert. Es zeigte sich, dass bei einem BMI1-Knockdown keine Metastasen ausgebildet wurden, hingegen in der Kontrollgruppe Metastasen in den Lungen zu finden waren (**ABB. 17-G und ABB. 17-H**). Weiterhin wurden metastasierende Krebszellen als eine unter anderem durch den Biomarker CD26 gekennzeichnete CSC-Subpopulation beschrieben (Pang et al., 2010). Deshalb wurde die CD26-Expression der kolorektalen Bulk-Kulturen in der Durchflusszytometrie untersucht. Es zeigte sich, dass signifikant weniger CD26-positive Zellen innerhalb kolorektaler Zellpopulationen bei einem BMI1-Knockdown nachgewiesen wurden (**ABB. 17-E und ABB. 17-F**).





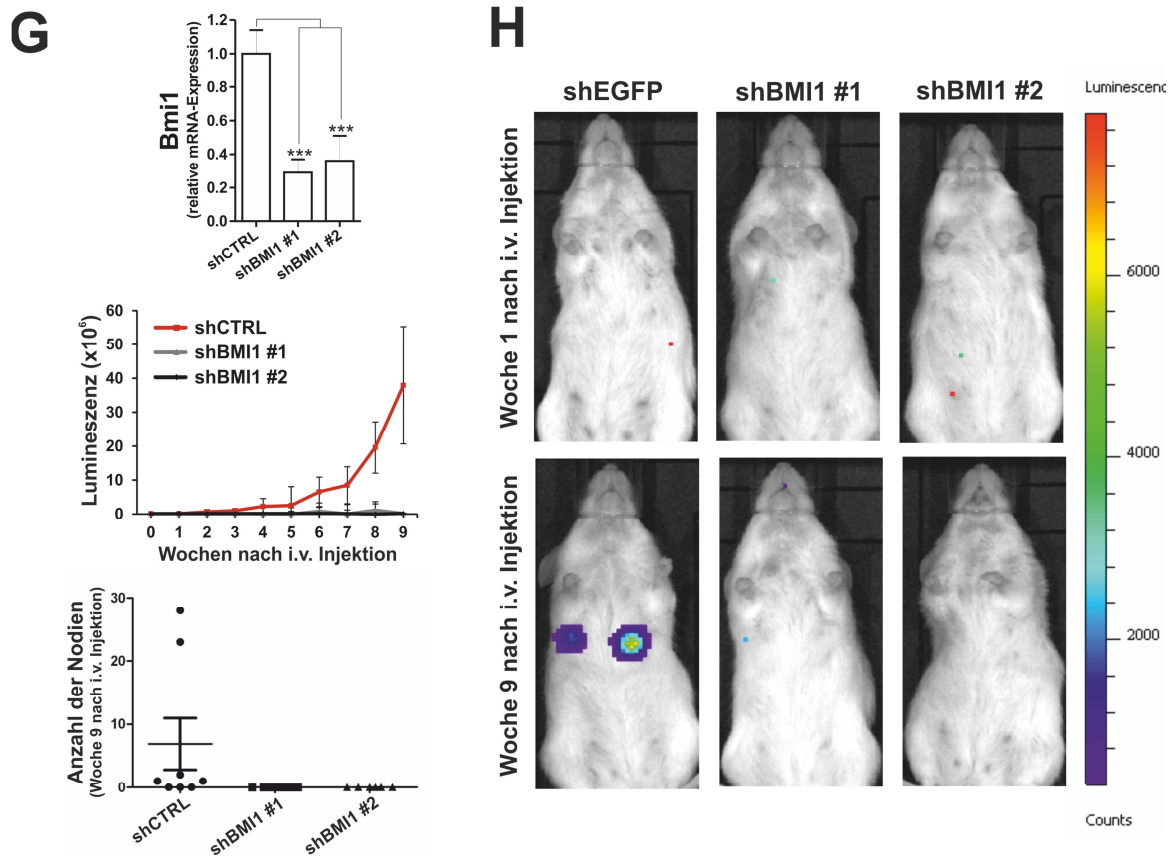


ABBILDUNG 17: BMI1 STEIGERT EMT UND METASTASIERUNGSFÄHIGKEIT IN HUMANEN KOLOREKTALEN TUMORZELLINIEN (A) Expressionsanalyse (mRNA) der EMT-assoziierten Marker SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1 und VIM sowie des epithelialen Markers CDH1 bei einem BMI1-Knockdown in COLO320, DLD1 und RKO (n=3). (B) Invasionsfähigkeit in Transwell-Experimenten (n=4). (C) Migrationsfähigkeit in Wundheilung-Versuchen (n=4). (D) Ausbildung makroskopischer Kolonien in Methylzellulose (n=4). (E) CD26⁺ Subpopulationen an metastasierenden CSCs und (F) repräsentative Durchflusszytometrie (G) Metastasierungsfähigkeit von i. v. in die Schwanzvene von NOD/SCID-Mäusen (n=8) injizierten SW620-luc Tumorzellen in die Lunge, bei einem BMI1-Knockdown und (H) repräsentative *in vivo imaging* Abbildungen (Kooperation mit Rene Jackstadt aus der Arbeitsgruppe „Experimentelle und Molekulare Pathologie“). Alle Darstellungen wurden mittels ImageJ Software (National Institutes of Health) ausgewertet. Es wurden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde über den t-Test bestimmt (* : p< 0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).

Zusammenfassend führte der Aktivitätsverlust von BMI1 zu einem verringerten EMT-Phänotyp in COLO320, DLD1 und RKO Bulk-Kulturen sowie zu einer reduzierten Metastasierungsfähigkeit. Dabei konnte eine Reduktion der über CD26⁺ charakterisierten, metastasierenden CSC-Populationen nachgewiesen werden. Folglich beeinflusst BMI1 neben der Chemoresistenz auch die Metastasierung von kolorektalen CSCs und damit die beiden essentiellen Faktoren für Prognosen von Patienten mit kolorektalen Karzinomen.

4. Diskussion

Im CSC-Modell werden Karzinogenese und Krebsprogression durch eine Subpopulation von Krebszellen bestimmt, den CSCs (Lapidot et al., 1994; Visvader and Lindeman, 2012; Bonnet and Dick, 1997). Dabei bilden diese CSCs über die Fähigkeit zur Selbsterhaltung (Bruggeman et al., 2007; Chiba et al., 2010; Yu et al., 2011) und Differenzierung eine hierarchische Tumororganisation aus und definieren sich über *Cancer-stemness*-Eigenschaften. Daneben wurde die Rolle der EMT, eines zellmorphologischen Transdifferenzierungsprogramms während der embryonalen Entwicklung, in der Krebsprogression diskutiert. Dieses Programm stellt in Krebszellen einen Hauptmechanismus für die Metastasierung dar (Thiery et al., 2009; Raimondi et al., 2010; Montemayor-Garcia et al., 2013; Liang et al., 2013; Zhao et al., 2013). Allerdings kann das EMT-Programm ebenfalls Zellen mit *Cancer-stemness*-Eigenschaften generieren (Wu, 2011; Hollier et al., 2013; Fan et al., 2012). Unabhängig davon können wiederum in CSC-Populationen EMT-assoziierte Marker identifiziert werden (Mani et al., 2008), sodass die EMT mit den CSC-Populationen verknüpft zu sein scheint. Zudem wurden CSC-Populationen auch direkt mit Metastasierung verknüpft (Hermann et al., 2007). Außerdem werden CSCs mit der Therapieresistenz in Krebserkrankungen in Verbindung gebracht (Dean et al., 2005). Zusammengefasst zeichnet sich ab, dass Hauptfaktoren in der Progredienz von Krebserkrankungen, wie *Cancer-stemness*-Eigenschaften, EMT, Metastasierung und Therapieresistenz, mit CSCs zusammenhängen. Daneben wurde in vielen humanen Krebserkrankungen eine hohe BMI1-Expression nachgewiesen, wie in Lymphomen, akuter myeloischer Leukämie, Leberkrebs, Brustkrebs, Prostatakrebs, nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Hals- und Kopfkrebs, Medulloblastomen, Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen (Hosen et al., 2007; Honig et al., 2010; Guo et al., 2011; Tabor et al., 2011; Vrzalikova et al., 2008; Li et al., 2009; Merkerova et al., 2007). Zudem konnte die erhöhte BMI1-Expression mit einer schlechten Prognose in unterschiedlichen Krebsarten verknüpft werden, wie beispielsweise in Leukämien, Neuroblastomen, Glioblastomen, hepatozellulären Karzinomen, Brustkrebs, Prostatakrebs, Lungenkrebs, Magenkrebs, Speicheldrüsenkrebs und kolorektalen Karzinomen (Glinsky, 2007; Vrzalikova et al., 2008; Wang et al., 2008; Li et al., 2010a; Song et al., 2010). Zusammengefasst implizieren diese Daten in vielen Krebsarten eine günstige Wirkung durch die Reduktion von BMI1. In dieser Arbeit wurde die Bedeu-

tung von BMI1 für kolorektale CSCs im Zusammenhang mit *Cancer-stemness*-Eigenschaften, EMT, Metastasierung und Chemoresistenz untersucht. Dabei konnte der Einfluss von BMI1 auf jeden dieser Vorgänge gezeigt werden.

Darüber hinaus wurden weitere biologische Funktionen von Krebszellen beschrieben (Hanahan and Weinberg, 2011; Hanahan and Weinberg, 2000). Da diese Funktionen allerdings nicht auf maligne Krebszellen beschränkt sind, wurde eine Relevanz für die Krebsprogression bereits in Frage gestellt (Lazebnik, 2010) (**ABB. 18**).

CSCs und deren *cancer stemness* können als Ursache kolorektaler Karzinome betrachtet werden, weshalb diese Arbeit den Einfluss von BMI1 auf den Phänotyp humaner kolorektaler CSCs analysiert. Dabei kann die Arbeit mit frisch-isoliertem und dissoziiertem humanen Tumorgewebe hervorragend zur Validierung von CSC-assoziierten Genen mit Therapiepotential dienen. Diese frisch isolierten Tumorzellen (O'Brien et al., 2007; Dalerba et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Todaro et al., 2007) geben die Situation in humanen Tumoren sehr gut wieder. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit Primärtumorzelllinien aus Gewebeproben kolorektaler Karzinomresektate etabliert, um deren Abhängigkeit von BMI1 zu untersuchen. Hierfür konnten insgesamt vier Primärtumorzelllinien (coCSC-AS1 bis coCSC-AS4) generiert werden. Hingegen wurden viele Ergebnisse in der CSC-Forschung aus Xeno-Transplantationsexperimenten abgeleitet, in denen humane Krebszellen in immundefizienten Mäusen zum Wachsen gebracht wurden. Leider wurde gezeigt, dass bereits nach zwei bis drei Passagen von xeno-transplantierten Tumoren die humane Mikroumgebung durch die murine Mikroumgebung ersetzt werden kann (Decaudin, 2011; Moro et al., 2012). In dieser Arbeit wurde eine Anpassung an die murine Mikroumgebung umgangen, indem humane Gewebeproben nicht transplantiert, sondern direkt in die Zellkultur überführt wurden. Hierbei konnte *in vitro* eine initiale Etablierungsrate von ungefähr 20% erreicht werden. Im Vergleich wurden die initialen *In-vivo*-Transplantationsraten mit unter 5% (Pretlow et al., 1993), 20% (Ginestier et al., 2007) oder 25% (Li et al., 2007) beschrieben. Somit waren die initialen Etablierungsraten in dieser Arbeit mit den berichteten initialen Transplantationsraten vergleichbar. Nachfolgend wurden die Primärtumorzelllinien (coCSC-AS1 bis coCSC-AS4) durch immunhistochemische Untersuchungen und Mutationsanalysen charakterisiert. Somit konnten diese gewonnenen Primärtumorzelllinien als geeignetes Modellsystem verifiziert werden, indem zum einen die morphologische und phänotypische Heterogenität der ursprünglichen Tumore nachgewiesen wurde und zum anderen bekannte Mu-

tationseignisse kolorektaler Tumorzellen bestimmt wurden. Zugleich wurde in dieser Arbeit ein zweites unabhängiges Modellsystem in Form von langzeitkultivierten kolorektalen Tumorzelllinien (COLO320, DLD1 und RKO) eingesetzt.

Zunächst wurden in diesen beiden kolorektalen humanen Modellsystemen BMI1-positive Tumorzellen nachgewiesen. Von den insgesamt vier Primärtumorzelllinien und den zwölf getesteten langzeitkultivierten Tumorzelllinien wurden alle als BMI1-positiv identifiziert. Dieses Ergebnis implizierte, dass wahrscheinlich ein Großteil aller kolorektalen Tumorzelllinien BMI1 exprimiert. Bekanntermaßen wurde BMI1 in unterschiedlichen Krebsarten mit humanen CSCs assoziiert (Song et al., 2009; Cui et al., 2007; Bertolini et al., 2009; Raaphorst, 2005; Oishi and Wang, 2011; Zhang et al., 2008). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei den BMI1-positiven Zellen in kolorektalen Tumorzelllinien um CSC-Populationen handelt. Um eine Abhängigkeit dieser vermutlichen kolorektalen CSC-Populationen von BMI1 zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit RNAi eingesetzt. Dies führte zu einer Reduktion der absoluten BMI1-Expressionen sowohl in Primärtumorzelllinien als auch in langzeitkultivierten Tumorzelllinien. Um diese BMI1-Abnahme im Zusammenhang mit CSCs zu analysieren, wurden die CSC-Populationen in diesen Tumorzelllinien mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hieraus resultierten bei einem BMI1-Verlust verkleinerte CSC-Populationen in kolorektalen Tumorzellpopulationen. Folglich führte die BMI1-Reduktion in dieser Arbeit zu einem Verlust des CSC-Phänotyps und damit einer Verkleinerung der CSC-Population. Da BMI1 die Pluripotenz von ESCs steuert sowie die *stemness* von ASCs, wäre eine vergleichbare BMI1-Regulation der *cancer stemness* von CSCs denkbar. Dazu reguliert BMI1 die Aktivität des PRC1, der wiederum durch Chromatinverdichtung zu einer Genstilllegung beiträgt. Somit reguliert BMI1 eine Vielzahl an Genen, die mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wurden (Siddique and Saleem, 2012).

Um die Bedeutung von neuen Kandidatengenen in der CSC-Forschung zu analysieren, wird als Goldstandard die Induktion des Tumorstwachstums nach s.c. Inokulation von Einzelzellsuspensionen oder Tumorfragmenten in immundefizienten Mäusen untersucht (Skidan and Steiniger, 2014). Damit müsste sich der BMI1-Einfluss auf die *Cancer-stemness*-Eigenschaften beziehungsweise den CSC-Phänotyp kolorektaler Tumorzellen nachweisen lassen. Vorteile dieser Technik liegen in der Reproduzierbarkeit und der Vergleichbarkeit von Experimenten sowie der einfachen Zugänglichkeit und Auswertung der induzierten Tumore. In der CSC-Forschung sind zudem

große Tumormassen für die Isolation und Charakterisierung der darin selten vorkommenden CSCs vorteilhaft. Dies ist bei s.c. Tumoren in Nagetieren der Fall. Deshalb wurden in dieser Arbeit Einzelzellsuspensionen aus den Primärtumorzelllinien in NOD/SCID-Mäuse injiziert. Ein Nachteil der s.c. Modellsysteme liegt allerdings in der fehlenden spezifischen Mikroumgebung mit deren unterstützenden Wachstumssignalen. Aufgrund dessen kann die Situation in humanen Tumoren nicht korrekt dargestellt werden. Eine Lösungsmöglichkeit hierfür besteht darin den Tumorzellen einen Mikroumgebungsersatz bereitzustellen, beispielsweise über ECM-simulierendes Matrigel (Fridman et al., 2012). Als eine weitere Möglichkeit können Tumorzellen zusammen mit humanen Stromazellen injiziert werden, welche die *In-vivo*-Mikroumgebung nachahmen (Alonso-Camino et al., 2011). In dieser Arbeit wurden Einzelzellsuspensionen in Verbindung mit Matrigel eingesetzt, da Matrigel leicht verfügbar und anwendbar ist. Es zeigte sich, dass der BMI1-Knockdown in Primärtumorzelllinien dieser Arbeit eine verringerte Tumorigenität in NOD/SCID-Mäusen bewirkte. Dieses Ergebnis wurde durch die bekannte reduzierte *In-vivo*-Tumorigenität der humanen kolorektalen Tumorzelllinien HT29 und LS174T beim Verlust von BMI1 unterstützt (Yu et al., 2012). Daneben wurde in dieser Arbeit eine verringerte Kapazität zur Sphäroidbildung (Goldstandard) in den Primärtumorzelllinien mit reduziertem BMI1 gezeigt, wodurch die Tumorigenitätsergebnisse verifiziert wurden. Zusammengefasst erhält BMI1 die CSC-Populationen in kolorektalen Karzinomen und kann zur Regulation des kolorektalen CSC-Phänotyps beziehungsweise der *cancer stemness* eingesetzt werden. In anderen Krebsarten konnte BMI1 ebenfalls mit der Erhaltung von CSC-Populationen (Bruggeman et al., 2007; Schuringa and Vellenga, 2010; Chiba et al., 2010) und der *cancer stemness* (Yu et al., 2011) in Verbindung gebracht werden.

Metastasierung ist die Haupttodesursache für Patienten mit kolorektalen Karzinomen. Dabei werden Krebszellen mit metastasierenden Eigenschaften als eine Subgruppe der CSC-Populationen betrachtet (Anderson et al., 2011a; Hermann et al., 2007). Hierfür spricht zum Beispiel die partielle Expression von EMT-Biomarkern (als Indikator für Metastasierung) in CSC-Populationen (Mani et al., 2008). In dieser Arbeit wurde die BMI1-Aktivität kolorektaler CSCs mit EMT-Biomarkern und mit den EMT-assoziierten Zelleigenschaften Invasion und Migration verknüpft. Zur Untersuchung der *In-vivo*-Metastasenbildung sind die oben besprochenen s.c. Modellsysteme wegen Einschränkungen in der Blutversorgung und der Lymphdrainage nicht ge-

eignet. Hingegen können Einzelzellsupsensionen beispielsweise i.v. oder i.c. injiziert werden um Metastasenbildung in unterschiedlichen Organen wie etwa Lunge, Leber (i.v.) oder Lunge, Knochen, Muskeln, Weichteilgewebe (i.c.) zu analysieren (Gupta et al., 2009; Charafe-Jauffret et al., 2009; Kruger et al., 2006). In dieser Arbeit wurden kolorektale Tumorzellen in die Schwanzvene von NOD/SCID-Mäusen injiziert und die Ausbildung von Lungenmetastasen analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass kolorektale Tumorzellen durch den Verlust von BMI1 die Fähigkeit zur Metastasenbildung verlieren. Um metastasierende kolorektale Tumorzellen als CSCs zu identifizieren, wurde die Kombination der Biomarker CD26 und CD133 vorgeschlagen (Pang et al., 2010). In dieser Arbeit wurde die Expressionsstärke von BMI1 mit CSC-Populationen verknüpft und darauf aufbauend die BMI1-Expression mit CD26-positiven Tumorzellen korreliert. Zusammengefasst beeinflusste BMI1 somit die metastasierenden CSCs in kolorektalen Tumorzellen. Weiterführend wäre eine Analyse der kolorektalen CSC-Populationen zur Klassifizierung und Charakterisierung in weitere Subpopulationen interessant, um beispielsweise metastasierende CSC-Subpopulationen zu identifizieren.

Bislang beruht das Therapieversagen bei kolorektalen Karzinomen weitestgehend auf Resistenzen der Krebszellen gegenüber den Chemotherapeutika aus den entsprechenden Leitlinien (Edwards et al., 2012). In dieser Arbeit wurde eine Chemotherapeutikumbehandlung von kolorektalen Tumorzellen in Abhängigkeit von BMI1 analysiert. Dazu wurde zunächst, unabhängig von einer Behandlung mit Chemotherapeutika, das Wachstumsverhalten der humanen kolorektalen COLO320, DLD1 und RKO bei einem BMI1-Verlust bestimmt. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit bei einer BMI1-Reduktion. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in den kolorektalen humanen Tumorzelllinien HT29 und LS174T eine verringerte Zellteilung bei einem BMI1-Verlust gemessen (Yu et al., 2012). Dies wurde durch die Beobachtung, dass BMI1 über p14^{ARF} und p16^{INK4A} die Proliferation fördert, unterstützt (Dimri et al., 2002; Park et al., 2004; Molofsky et al., 2005). Deshalb wurden die Ergebnisse dieser Arbeit mittels Zellzyklusanalysen nachvollzogen. In den Zellzyklusanalysen der COLO320, DLD1 und RKO wurde eine tendenziell vergrößerte G1-Phase (G1-Arrest) und gesenkte Apoptose bei einem BMI1-Verlust gemessen. Hingegen wurden während einer Chemotherapeutikumbehandlung eine gesteigerte Apoptose bei einem BMI1-Verlust, sowie eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit gemessen. Folglich könnte der in dieser Arbeit durch eine BMI1-

Reduktion herbeigeführte Verlust des CSC-Phänotyps zu einer Vergrößerung der schnell-proliferierenden Tumorzellpopulationen (und damit der Wachstumsgeschwindigkeit) geführt haben. Zugleich hatten diese schnell-proliferierenden Tumorzellen jedoch die über BMI1-vermittelten Resistenzen verloren, sodass durch Zugabe eines Chemotherapeutikums die Tumorzellpopulationen insgesamt langsamer proliferierten und sich zugleich größere Populationsanteile in Apoptose befanden. Damit wurde ein fördernder Einfluss von BMI1 auf die Chemoresistenz von kolorektalen Tumorzellen beobachtet. Letztendlich wurde ein Vergleich der oben aufgeführten gegensätzlichen Wachstumsgeschwindigkeiten aufgrund der unterschiedlichen Tumorzelllinien erschwert. Durch die unterschiedlichen Tumorzelllinien muss eine nicht bekannte Anzahl an weiteren regulatorischen Faktoren in Betracht gezogen werden, die zu unterschiedlichem Wachstumsverhalten führen könnten (Tian et al., 2011). Zudem könnte sich der unterschiedliche experimentelle und labortechnische Hintergrund ebenfalls in den Ergebnissen niederschlagen.

Als am häufigsten verwendetes Chemotherapeutikum in den S3-Leitlinien kolorektaler Karzinome wurde in dieser Arbeit das Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU) eingesetzt. 5-FU wird aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit den Pyrimidinbasen Cytosin, Thymin und Uracil an deren Stelle in RNA und DNA eingebaut. Hierbei wird 5-FU in 5-Fluor-UMP umgewandelt, dieses zu 5-Fluor-UTP phosphoryliert und in RNA eingebaut. Dies führt zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese. Darüber hinaus hemmt 5-Fluor-dUMP die Thymidylat-Synthase und somit auch die DNA-Synthese. Da BMI1 als Bestandteil von PRC1 zu einer Chromatinverdichtung führt und damit zu einer Genstilllegung beiträgt, wirkt diese BMI1-Aktivität der während der Synthese erfolgenden RNA/DNA-Schädigung durch 5-FU entgegen. Deshalb könnten die kolorektalen Tumorzellen im Fall einer BMI1-Reduktion angreifbarer für 5-FU geworden sein. Daneben reguliert BMI1 eine Vielzahl an Genen (Simon and Kingston, 2009), die wiederum durch noch unbekannte Einflüsse ebenfalls zu einer Resistenz gegenüber 5-FU beigetragen haben könnten. Zusammengefasst besteht theoretisch die Möglichkeit, kolorektale CSC-Populationen über die Inhibition der BMI1-Expression gegenüber Chemotherapien zu sensibilisieren.

Hierzu wurde bereits von einigen Pharmaka berichtet, welche die BMI1-Expression reduzierten. Beispielsweise wurde eine reduzierte BMI1-Expression durch den Einsatz von Histonacetylase-Inhibitoren (HDACI) wie Natriumbutyrat und Valproinsäure in Brustkrebszellen erreicht (Bommi et al., 2010). Eine weitere Arbeit-

gruppe berichtete von vergleichbaren Ergebnissen (Jung et al., 2010). Daneben wurde der inhibierende Effekt von Artimisinin auf die BMI1-Expression sowohl auf RNA- als auch Protein-Ebene in nasopharyngealen Tumorzellen gezeigt (Wu et al., 2011). Allerdings handelte es sich hierbei vermutlich um keine spezifische BMI1-Inhibition. Außerdem wäre theoretisch eine direkte Inhibition der BMI1-Expression über siRNA möglich, wenn eine entsprechende therapeutische Darreichungsform von siRNAs entwickelt werden würde. Überdies wird BMI1 durch einige Faktoren wie SALL4, FoxM1, c-Myc, E2F-1, HDAC und PCGF2 reguliert (Nowak et al., 2006; Jung et al., 2010; Li et al., 2008; Yang et al., 2007; Guo et al., 2007). Jeder dieser regulierenden Faktoren stellt eine potentielle Einflussmöglichkeit zur Reduktion der BMI1-Expression dar. Beispielsweise reduzierte das BMI1-Homolog PCGF2 erfolgreich die BMI1-Expression (Guo et al., 2007) über die Repression von c-Myc. Dabei ist BMI1 ein Zielgen von c-Myc. Weitere Strategien, die therapeutisch auf BMI1 abzielen, könnten aus der post-transkriptionellen Regulation und der post-translationalen Regulation von BMI1 entwickelt werden. Hierzu wurde von einer starken BMI1-Regulation durch post-transkriptionelle Modifikationen berichtet und dabei mehrere AREs im 3'-UTR und eine starke IRES-Aktivität im 5'-UTR von BMI1 beschrieben (Cao et al., 2011b). Demnach könnte theoretisch mit Pharmaka auf die post-transkriptionelle Regulation von BMI1 eingewirkt werden, um die BMI1-Translation zu reduzieren. Post-translational konnte das BMI1-Protein durch die MAPKAPK3 phosphoryliert werden, wodurch dessen Dissoziation vom Chromatin bewirkt wurde (Voncken et al., 2005). Daneben wurde von einer EGF-induzierten Akt-Aktivierung berichtet, welche das BMI1-Protein phosphorylierte und damit vor dem Abbau durch Proteasomen schützte (Kim et al., 2011). So könnte beispielsweise in der post-translationalen Regulation durch die Aktivität der MAPKAPK3 eine erhöhte Phosphorylierung von BMI1 erreicht und damit eine Dissoziation des PRC1 vom Chromatin bewirkt werden. In Folge könnten Tumorsuppressorgene wie zum Beispiel p14^{ARF} und p16^{INK4A} wieder in den Tumorzellen exprimiert werden. Außerdem wurde die moderate Reduktion der Proteinexpression von BMI1 als eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit diskutiert, da Tumorzellen hierauf stärker ansprechen als normale Zellen (Liu et al., 2006). Weitere Therapiemöglichkeiten könnten theoretisch durch eine Kombination dieser Therapien, wie zum Beispiel von HDACi und Artimisinin entstehen. Letztendlich könnten allerdings ASCs durch ihre Abhängigkeit von BMI1 ebenso von therapeutischen Maßnahmen bezüglich BMI1 betroffen sein wie

CSCs. Deshalb muss ein potentieller Nutzen solcher inhibierender Verfahren in kolorektalen Karzinomtherapien noch eingehender untersucht werden.

Da *Cancer-stemness*-Eigenschaften, EMT, Metastasierung und Chemoresistenz mit CSCs verbunden sind, können letztendlich CSC-Populationen für das Therapieversagen und das Auftreten von Rezidiven verantwortlich gemacht werden. Dabei hängt die Progression der Krebserkrankung von der Größe der CSC-Population ab. Dadurch ist für Krebspatienten eine Identifizierung und exakte Quantifizierung der CSC-Populationen essentiell (Blagosklonny, 2006). Dabei wird meist - aufgrund der Erfahrungen im ASC-Modell - von geringen CSC-Frequenzen ausgegangen. Aber in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass extreme Unterschiede in CSC-Anteilen verschiedener Krebszellpopulationen möglich sind. Dabei zeigten sich in DLD1 und RKO geringe CSC-Anteile (circa 5%) im Vergleich zu COLO320 mit relativ hohen CSC-Anteilen (circa 30%). Zudem wurde im Vergleich zwischen diesen langzeitkultivierten Tumorzelllinien und den primären Tumorzelllinien dieser Arbeit (circa 70% CSC-Anteil) ein noch größerer Unterschied in kolorektalen CSC-Populationen aufgezeigt. Andere Arbeiten unterstützten dieses Ergebnis durch extrem unterschiedliche prozentuale CSC-Anteile in verschiedenen Tumorzelllinien (Kelly et al., 2007; Baccelli and Trumpp, 2012). Hier wurden CSC-Anteile von 0,2% (Li et al., 2007) bis hin zu 82,5% (Kong et al., 2008) angegeben.

Diese Arbeit demonstriert eine Regulation von kolorektalen CSC-Populationsgrößen über die BMI1-Aktivität. Daneben konnten variable CSC-Frequenzen während des Krankheitsverlaufs von Brustkrebs demonstriert werden (Pece et al., 2010). Folglich weisen CSC-Populationen eine quantitative Plastizität auf, die im Fall von kolorektalen CSCs essentiell über BMI1 beeinflusst werden kann. Daneben wären in Krebserkrankungen auch mehrere CSC-Populationen basierend auf unterschiedlichen CSC-Klonen mit unterschiedlichen Eigenschaften denkbar. Eine Variation in dieser klonalen Dynamik wurde in neueren Arbeiten als weiterer entscheidender Faktor angeführt (Kreso et al., 2013). Demzufolge besitzen CSC-Populationen eine Plastizität bezüglich ihrer klonalen Zusammensetzung und sollten zukünftig nach CSC-Klonen beziehungsweise CSC-Subpopulationen, klassifiziert werden. Hierzu könnte eine funktionelle Klassifizierung nach therapeutisch-relevanten, wie beispielsweise metastasierenden und therapieresistenten, CSC-Subpopulationen praktikabel sein. Überdies sollte auch eine äußerst relevante phänotypische Plastizität von Tumorzellpopulationen diskutiert werden, welche diesen

Populationen erlaubt, ihre Eigenschaften nach Bedarf anzupassen. Dieses plastische Verhalten von Tumorzellen bezüglich ihres Phänotyps könnte theoretisch zu einem erneuten Ausbruch der Krebserkrankung führen. Dabei könnten therapeutisch eliminierte CSC-Populationen hypothetisch nachgebildet werden, indem verbleibende Tumorzellen durch passende Stimuli einen CSC-Phänotyp ausbilden. In dieser Arbeit wurde BMI1 als regulativer Faktor identifiziert sowohl für die Populationsgröße an CSCs als auch den malignen Zellphänotyp kolorektaler Tumorzellen, der Eigenschaften wie *cancer stemness*, EMT, Metastasierung und Chemoresistenz beeinflusst (ABB. 18).

Vielleicht liefert dieses plastische beziehungsweise dynamische CSC-Verhalten potentielle Möglichkeiten, gegen CSC-Populationen therapeutisch vorzugehen. Zum Beispiel zeigten neuere Arbeiten, dass ruhende und damit chemoresistente normale Stammzellen aktiviert werden können, um auf Chemotherapien anzusprechen (Essers and Trumpp, 2010; Essers et al., 2009). Dieses Konzept einer prätherapeuti-

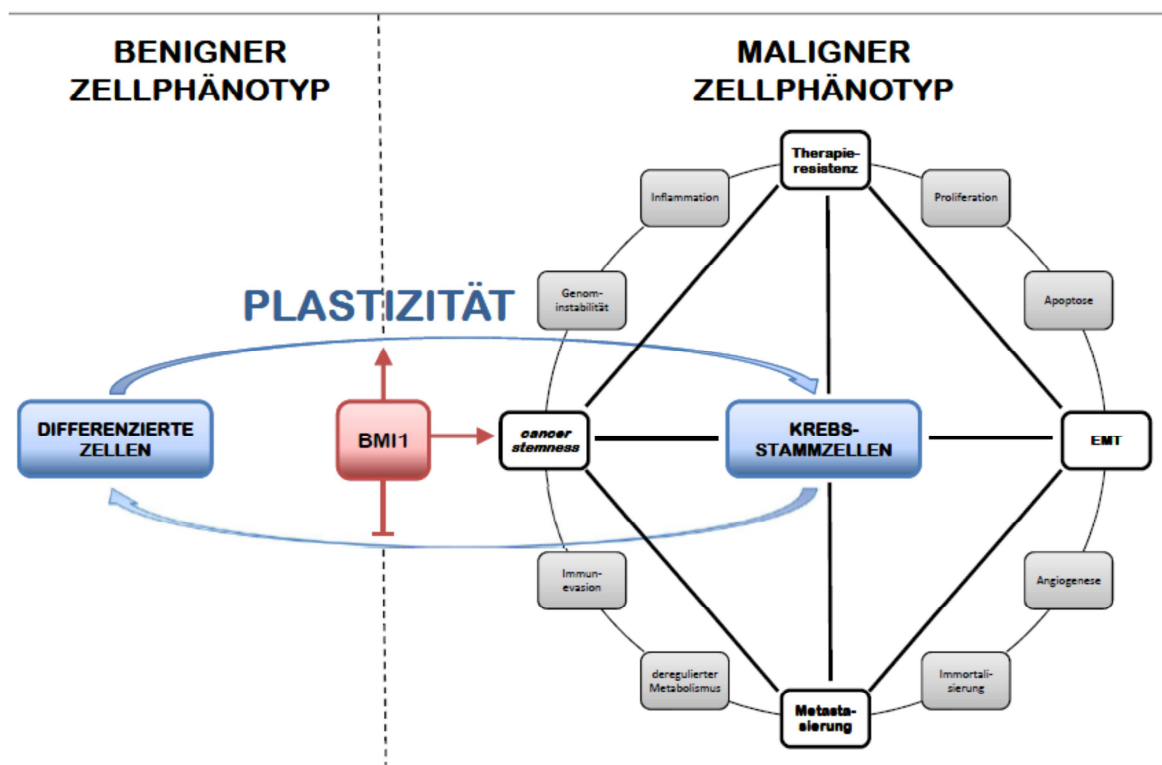


ABBILDUNG 18: MODELL ZUR AUSPRÄGUNG EINES CSC-PHÄNOTYPS DURCH BMI1 Unter den malignen Eigenschaften von Krebszellen (zum Beispiel *hallmarks of cancer*) sind einige essentiell für die Karzinogenese und Krebsprogression, wie ‘*cancer stemness*’, ‘EMT’, ‘Metastasierung’ und ‘Therapieresistenz’. Diese essentiellen Funktionen sind über die plastische Krebsstammzell-Population (CSC-Population) miteinander verbunden und somit nicht klar voneinander abgegrenzt. Dabei könnte BMI1 sowohl auf die Erhaltung und Größe kolorektaler CSC-Population über den plastischen Zellphänotyp regulieren als auch direkt auf die *Cancer-stemness*-Eigenschaften sowie EMT, Metastasierung und Chemoresistenz einwirken.

schen Aktivierung konnte erfolgreich auf Behandlungsschemata für CSCs in AML- und CML-Mausmodellen übertragen werden (Ito et al., 2008; Saito et al., 2010). Jedoch stellt sich nach einer therapeutischen Behandlung von CSC-Populationen immer die Frage, ob ausnahmslos alle CSCs eliminiert werden konnten oder verbleibende CSCs zum erneuten Ausbruch der Krebserkrankung führen könnten (Aguirre-Ghiso, 2007; Pantel et al., 2009). Dabei könnten verschiedene CSC-Klone in einer Krebserkrankung eine erfolgreiche Behandlung zusätzlich erschweren (Kreso et al., 2013), indem einzelne CSC-Klone unterschiedlich auf spezifische Therapien ansprechen könnten - zum Beispiel aufgrund verschiedener Resistenzen. Demzufolge dürfte eine komplette CSC-Elimination mittels Einzeltherapien schwierig und eine auf alle CSC-Subpopulationen einer Krebserkrankung abzielende Kombinationstherapie vielversprechender sein. Zusammengenommen wäre es sicherlich sinnvoll die Plastizität und Dynamik von CSC-Populationen zu nutzen, indem beschriebene Konzepte zu einer prätherapeutischen Aktivierung beziehungsweise Therapiesensibilisierung von CSCs weiterentwickelt und umgesetzt würden. Hierzu sind eine exakte Identifikation und quantitative Überwachung der CSC-Population beziehungsweise entsprechender Subpopulationen einer Krebserkrankung wahrscheinlich unerlässlich. Im Fall von kolorektalen CSC-Populationen könnten die regulativen Eigenschaften von BMI1 genutzt werden, dessen Expression die Ausprägung vom benignen Zellphänotyp zum malignen CSC-Phänotyp reguliert. Dabei nimmt BMI1 für die malignen CSC-Eigenschaften der *cancer stemness*, der EMT, der Metastasierung und der Therapieresistenz in kolorektalen Krebszellen eine zentrale Rolle ein (**ABB. 18**) und könnte sich insgesamt als Masterregulator für die Malignität kolorektaler Karzinome herausstellen. Allerdings wurden in der Brustkrebsforschung Hinweise gefunden, die gegen eine onkogene Zelltransformation durch eine alleinige Überexpression von BMI1 sprechen (Hoenerhoff et al., 2009). Hingegen wurde in Leukämien nachgewiesen, dass ausschließlich BMI1-exprimierende LSCs die Fähigkeit besitzen, die Krebserkrankung auszubilden (Lessard and Sauvageau, 2003). Aufgrund dessen muss die Bedeutung von BMI1 für kolorektale Karzinome weiterhin untersucht werden.

5. Methodik

5.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Tumorzelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37°C, 5%-CO₂ Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Alle Tumorzelllinien wurden regelmäßig mit *PCR Mycoplasma Test Kits* (AppliChem, Katalognummer: A3744) getestet und nur in Experimente eingesetzt, wenn keine Mykoplasmen nachgewiesen werden konnten.

5.1.1 Langzeitkultivierte Tumorzelllinien

Die humanen kolorektalen Tumorzelllinien CACO2, COLO320, DLD1, HTC15, HTC116, LS174T, RKO, SW403, SW480, SW620, SW1222 und T84 wurden entweder über DSMZ (Deutschland) oder ATCC (USA) bezogen. Ihre Zellidentität wurde durch eine DNA-Typisierung validiert. Alle Tumorzelllinien wurden in *DMEM/Ham's F-12 (1:1)* (Biochrom AG, Katalognummer: FG4815) kultiviert mit Ausnahme der Zelllinie COLO320, die in *RPMI 1640 Medium* (Biochrom AG, Katalognummer: FG1215) kultiviert wurde. Beide Zellkulturmedien wurden mit je 10% (v/v) FBS (Biochrom AG, Katalognummer: S0115) ergänzt. In Abständen von etwa drei bis fünf Tagen wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Die Tumorzelllinien wurden bei einer Konfluenz von circa 80-90% mit Hilfe von *Trypsin/EDTA Lösung* (Biochrom AG, Katalognummer: L2148) passagiert.

Für eine Behandlung mit Chemotherapeutika wurden Tumorzelllinien bis zu einer Konfluenz von etwa 40-50% kultiviert. Danach wurde entweder *5-Fluorouracil* (Sigma-Aldrich, Katalognummer: F6627) oder *Irinotecan hydrochloride* (Sigma-Aldrich, Katalognummer: I1406) oder *Oxaliplatin* (Sigma-Aldrich, Katalognummer: O9512) nach Angaben des Herstellers gelöst und direkt dem Kulturmedium zugegeben (Konzentrationen siehe 3.2.4). In den Tumorzellen auftretende Effekte wurden nach durchschnittlich drei bis sechs Tagen untersucht.

5.1.2 Primär-Tumorzelllinien

Primär-Tumorzelllinien wurden direkt aus Gewebeproben von kolorektalen Karzinomresektaten generiert mit Hilfe des Protokolls "*Generating single-cell suspension from human colon cancer tissue*" (Kreso and O'Brien, 2008). Alle verwendeten Gewebeproben und dazugehörigen Patientendaten stammten entweder von der gemeinnüt-

zigen Stiftung HTCR (Thasler et al., 2003) oder aus einer Kooperation mit der klinischen Forschergruppe "Molekulare Tumorbologie" (PD Dr. Klaus-Peter Janssen) der TUM. Etablierte Primär-Tumorzelllinien wurden nach dem Protokoll "*Culturing colon cancer cells as spheres*" (Kreso and O'Brien, 2008) kultiviert. Dazu wurde *StemPro® hESC SFM Medium* (Life Technologies, Katalognummer: A1000701) ergänzt durch 0,02 µg/ml EGF (Life Technologies, Katalognummer: PHG0311) und 0,01 µg/ml FGFb (Life Technologies, Katalognummer: PHG0026) eingesetzt. Zudem wurden *Ultra-Low Attachment Surface* Kulturgefäße von Corning Life Sciences verwendet.

Die Ausdifferenzierung von Primär-Tumorzelllinien zu SDACs erfolgte in *DMEM/F-12 (1:1) (1x) + GlutaMAX™* (Life Technologies, Katalognummer: 32332-028) ergänzt durch 10% (v/v) FBS (Biochrom AG, Katalognummer: S0115) und Standardkulturgefäßen für Adhärenz-Kulturen (Corning Life Sciences). Auch hier wurde das Medium durchschnittlich alle drei bis fünf Tage gewechselt. Ein zellmorphologisch sichtbarer Differenzierungserfolg stellte sich nach circa 14-21 Tagen ein.

5.2 RT-qPCR

Zur Detektion und Quantifizierung von RNA-Expressionen wurden RT-qPCRs eingesetzt. Zunächst wurde die komplette RNA durch *RNeasy mini Kits* (Qiagen, Katalognummer: 74104) und einem *QIAcube MiniPrep Robot* von Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert. Daraufhin wurden RNA-Konzentrationen mit Hilfe eines *Nano Drop Spectrophotometer ND-1000* (peqlab Biotechnologie GmbH) bestimmt. Anschließend RT-PCRs wurden mit *RevertAid™ Reverse Transcriptases* (Katalognummer: EP0441) und dazugehörigen Reagenzien von Fermentas Life Sciences nach Protokollen des Herstellers durchgeführt. Für qPCRs wurde die *Universal Probe Library* Technik von Roche Applied Science verwendet. Entsprechende Primer wurden mit Hilfe des online *Assay Design Center* der Roche Applied Science Website entworfen und zusammen mit empfohlenen *UPL-probes* verwendet (**TAB. 5**). Dazu wurde ein Light-Cycler 480 von Roche Applied-Science nach Bedienungsanleitung des Herstellers eingesetzt. Um absolute RNA-Konzentrationen innerhalb der qPCR-Messungen zu bestimmen, wurden Standardreihen von 1×10^8 bis 1×10^2 Kopien (cDNA des entsprechenden Gens) verwendet. Für die statistische Auswertung wurden alle Messungen in Triplikaten durchgeführt und auf die Referenzgene β -ACTIN,

TABELLE 5: PRIMER UND EMPFOHLENE UPL-PROBES FÜR QPCRS MITTELS UNIVERSAL PROBE LIBRARY TECHNIK

Genname	UPL- <i>probe</i>	Primer (<i>sense</i>)	Primer (<i>antisense</i>)	Amplikon [nt]
ALDH1A1	82	CCAAAGACATTGATAAAGCCATAA	CACGCCATAGCAATTCCACC	77
BMI1	54	TGTAAAACGTGTATTGTTCTGTACC	CAATATCTTGAGAGTTTTATCTGACC	121
CD133	83	TCCACAGAAATTTACCTACATTGG	CAGCAGAGAGCAGATGACCA	77
CD166	6	GGCAGTGGAAGCGTCATAA	CATTCTCTTCAGGGGAAATGA	91
CD44	39	GGTCCCATACCACTCATGGA	TCCTTATAGGACCAGAGTTGTG	90
CDX1	70	ACGCCCTACGAGTGGATG	TGTCCTTGGTCCGAGTCTTAC	76
CDX2	34	ATCACCATCCGGAGGAAAG	TGCGGTTCTGAAACCAGATT	82
CLAUDIN1	66	CCCTATGACCCCAGTCAATG	ACCTCCCAGAAGGCAGAGA	88
CTNNB1	21	AGCTGACCAGCTCTCTCTTCA	CCAATATCAAGTCCAAGATCAGC	73
E-CADHERIN	35	CCGGGGACAACGTTTATTAC	GCTGGCTCAAGTCAAAGTCC	72
FIBRONECTIN	15	CTTTGGTGCAGCACAACTTC	TCCTCCTCGAGTCTGAACCA	90
HPRT	73	TGACCTTGATTATTTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCTCT	102
hTERT	46	CACGCGAAAACCTTCCTC	ACCACTGTCTTCCGCAAGTT	80
KRT20	66	TGTCCTGCAAATTGATAATGCT	AGACGTATTCCTCTCTCAGTCTCATA	78
LGR5	25	AATCCCTGCCAGTCTC	CCCTTGGAATGTATGTCAGA	74
MSI1	51	CCAATGGGTACCACTGAAGC	ACTCGTGGTCCTCAGTCAGC	72
p14ARF	12	CCTGTGTCCTCGACTCACC	CAGTAAAGCAGGGCAAGGA	63
p16INK4A	34	GACCTGGCTGAGGAGCTG	TTCAATCGGGGATGTCTGA	127
p38 (Synaptophysin)	79	CCAATCAGATGTAGTCTGGTCAGT	AGGCCTTCTCTGAGCTCTT	70
SLUG	7	TGGTTGCTTCAAGGACACAT	GTTGCAGTGAGGGCAAGAA	66
SNAIL	11	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA	ATCTCCGGAGGTGGGATG	84
TWIST1	6	GGCATCACTATGGACTTTCTCTATT	GGCCAGTTTGATCCCAGTATT	95
VIMENTIN	13	TACAGGAAGCTGCTGGAAGG	ACCAGAGGGAGTGAATCCAG	104
YWHAZ	30	GATCCCCAATGCTTCACAAG	TGCTTGTTGTGACTGATCGAC	130
ZEB1	3	GGGAGGAGCAGTGAAAGAGA	TTTCTTGCCCTTCTTTCTG	70
β-ACTIN	64	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	97

5.3 Westernblot

Zum Nachweis von Proteinen wurden Westernblots basierend auf der *Tank-Blotting* Technik im “*Protein Blotting Guide*“ und einem *Mini Trans-Blot Cell Blotter* von Bio-Rad Laboratories durchgeführt. Dazu wurden die Proteinkonzentrationen von *Whole Cell Lysates* durch *DC Protein Assay Kits* (Bio-Rad Laboratories, Katalognummer: 500-0111) bestimmt. Je 50µg eines Proteinlysates beziehungsweise 5µl des *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Katalognum-

mer: 26619) wurden in 10%-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Diese aufgetrennten Proteine wurden auf *Immun-Blot-PVDF-Membranen 0,2µm* (Bio-Rad Laboratories, Katalognummer: 162-0177) transferiert. Danach wurden diese Membranen mittels 5% (w/v) *Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk* (Bio-Rad Laboratories, Katalognummer: 170-6404) in Puffer blockiert. Der Primärantikörper *mouse-anti-human BMI1* (AbD SeroTec, Klonnummer: MCA3993Z) wurde in einer 1:1.000 Verdünnung über Nacht eingesetzt, der Sekundärantikörper *rabbit-anti-mouse IgG* (Thermo Scientific, Katalognummer: 31452) in einer 1:10.000 Verdünnung für zwei Stunden. Als Referenz wurde *mouse-anti-β-actin* Antikörper (Sigma-Aldrich, Katalognummer: A5441) in einer 1:1.000 Verdünnung für 30 Minuten und der bereits beschriebene Sekundärantikörper 1:10.000 für 30 Minuten eingesetzt. Anschließende Detektionen wurden mittels *Amersham ECLTM Prime Western Blot Reagents* (GE Healthcare, Katalognummer: RPN2232SK) und *Amersham HyperfilmTM ECL* (GE Healthcare, Katalognummer: 28906835) nach Gebrauchsanleitung des Herstellers durchgeführt. Abschließend wurden auf den Filmen sichtbare Banden gescannt und densitometrisch vermessen. Diese Messwerte wurden auf β-ACTIN normiert.

5.4 RNA-interference mittels lentiviraler Transduktion

Für eine Reduktion der BMI1-Expression in kolorektalen Tumorzelllinien wurde ein Satz von fünf *RNAi MISSION[®] - Lentiviral Transduction Particles* von Sigma-Aldrich verwendet, der für BMI1-spezifische shRNAs kodierte (TRCN0000020155, TRCN0000020156, TRCN0000020157, TRCN0000020158 und TRCN0000229418). Als Kontrolle wurden *Control Transduction Particles* mit eGFP-spezifischer shRNA (SHC005V) eingesetzt. Vor den Infektionen wurde dem Kulturmedium Polybren (Sigma-Aldrich, Katalognummer: 107689) mit einer Endkonzentration von 8µg/ml zugegeben. Die Tumorzellen wurden mit einer MOI von fünf infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Tumorzellen passagiert und auf eine in den *Transduction Particles* kodierten Puromycin-Resistenz hin selektiert. *Puromycin Dihydrochloride* (Calbiochem - Merck Chemicals, Katalognummer: 540 411) wurde in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: COLO320-3,0µg/ml, DLD1-1,0µg/ml, RKO-1,0µg/ml, coCSC-AS3-10,0µg/ml und coCSC-AS4-10,0µg/ml.

5.5 Zellzyklusanalysen und Wachstumskinetiken

Um Zellzyklus-Phasen (G1, S und G2/M) innerhalb kolorektaler Tumorzelllinien identifizieren zu können, wurde deren DNA-Gehalt mittels PI-Färbung untersucht. Dazu wurden Tumorzellen nach dem Protokoll *“Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry”* (Darzynkiewicz and Huang, 2004) analysiert. Messungen wurden am *Accuri C6 flow cytometer* von *Becton, Dickinson and Company* durchgeführt und mit Hilfe einer zugehörigen *C-Flow Plus Software* ausgewertet. Im daraus resultierenden DNA-Histogramm markiert das Minimum zwischen sub-G1 Peak und G1 Peak die Grenze zu apoptotischen Zellen und wurde dazu genutzt, sich in Apoptose befindende Populationsanteile prozentual zu bestimmen. Da aus den Zellzyklusanalysen in der Durchflusszytometrie bereits die exakten Zellzahlen der eingesetzten Proben hervorgehen, wurde diese Tatsache genutzt, um simultan zellspezifische Wachstumskinetiken zu bestimmen. Dazu wurde in der experimentellen Planung und Umsetzung das exakte Verhältnis von Volumina und Tumorzellen berücksichtigt. Veränderungen sowohl im Zellzyklus als auch in der Zellzahl wurden über einen Zeitraum von drei bis acht Tagen mittels mehrerer Messungen verfolgt. Für eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde in Triplikaten gearbeitet.

5.6 Migration in Wundheilungsexperimenten

Um die Migrationsfähigkeit kolorektaler Tumorzellen zu bestimmen, wurde das Zusammenwachsen zweier geometrisch-definierter Zellmonolayer untersucht. Die definierten Spalten zwischen den Monolayern konnten durch den Einsatz von *Culture-Inserts* (ibidi GmbH, Katalognummer: 80206) nach Protokoll des Herstellers gewährleistet werden. Dazu wurden Zellen auf eine Konzentration von $7-8 \times 10^5$ Zellen pro ml Kulturmedium eingestellt und jeweils 70 μ l pro Vertiefung eines *Culture-Inserts* ausgesät. Für eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde in Quadruplikaten gearbeitet. Nach der Zellanheftung (durchschnittlich 24 Stunden) wurden die *Culture-Inserts* entfernt und das Kulturmedium gewechselt, um Zellen in Suspension zu entfernen. Das Zusammenwachsen zweier geometrisch-definierter Zellmonolayer wurde fotografisch dokumentiert und anschließend mittels der *ImageJ-Software* vom NIH ausgewertet.

5.7 Invasion in Transwell-Assays

Für Invasionsexperimente wurde die Fähigkeit kolorektaler Tumorzellen, eine ECM-simulierende Schicht zu durchdringen, getestet. Dazu wurden *ThinCert™ cell culture inserts* mit 8 µm Porengröße (Greiner Bio-One GmbH, Katalognummer: 662 638) nach Anleitung des Herstellers und in Verbindung mit 24-Napf-Platten (Corning Life Sciences) verwendet. Zuerst wurden die *ThinCerts* mit je 100µl *Matrigel™* (BD Biosciences, Katalognummer: 356234) in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml beschichtet. Für eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde in Quadruplikaten gearbeitet. Auf diese Matrigel™-Schichten wurden Zellsuspensionen aus je 100.000 Zellen in 200µl Medium (ohne FBS) gegeben. In 24-Napf-Platten wurden 500µl Medium ergänzt durch 20% (v/v) FBS pro Napf vorgelegt. Die vorbereiteten *ThinCerts* wurden in die gefüllten Näpfe überführt. Daraufhin migrierten die kolorektalen Tumorzellen in den *ThinCerts* in Richtung des chemischen Lockstoffs FBS und damit durch die Matrigel™-Schicht. Nach etwa drei Tagen Inkubation wurden die *ThinCerts* entnommen und das Medium aus der Kammer entfernt. Invasive Tumorzellen wurden auf dem *ThinCert*-Filter für zehn Minuten in Methanol (100%) fixiert. Danach wurden die fixierten Tumorzellen für zehn Minuten in 0,1% (w/v) Kristallviolett (gelöst in 20% Methanol) gefärbt. Anschließend wurden die *ThinCerts* mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Von der zellbehafteten Membran wurden Fotografien angefertigt und die gefärbten Zellen mittels *ImageJ-Software* vom NIH ausgezählt.

5.8 Kolonisationsfähigkeit in Methylzellulose-Assays

Zur Bestimmung des Transformationsstatus kolorektaler Tumorzelllinien wurde das *anchorage-independend* Zellwachstum mittels Methylzellulose-Assays untersucht. Dazu wurden Zellsuspensionen aus 500 Zellen pro ml Kulturmedium mit 0,01% (w/v) *Methocel* (Sigma-Aldrich, Katalognummer: 64632) hergestellt. Je 1ml Zellsuspension wurde pro *Petrischale 35mm Durchmesser* (Greiner Bio-One GmbH, Katalognummer: 627 161) ausgesät. Für die statistische Auswertung wurde in Quadruplikaten gearbeitet. Nach circa zehn bis vierzehn Tagen Inkubationszeit wurden makroskopische Kolonien sichtbar. Um lebende Kolonien anzufärben, wurden pro Petrischale 200µl von einer 1mg/ml konzentrierter *Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT) Lösung* (Sigma-Aldrich, Katalognummer: M5655) zugegeben und über Nacht inkubiert. Lebende Zellen verstoffwechselten die gelbe MTT-Lösung zu dunkelblauem MTT-

Formazan. Die Petrischalen wurden fotografiert und blaugefärbte lebende Kolonien mit Hilfe der *ImageJ-Software* vom NIH ausgezählt.

5.9 CD26-Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Bestimmung des Oberflächenmarkers CD26 auf kolorektalen Tumorzellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen mittels des *CD26-PE (human) Antikörpers* (Miltenyi Biotec GmbH, Katalognummer: 130-093-440) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde in Triplikaten gearbeitet. Dazu wurde ein *Accuri C6 flow cytometer* von *Becton, Dickinson and Company* eingesetzt. Auswertungen erfolgten an einer zugehörigen *C-Flow Plus Software*.

5.10 ALDH-Aktivität und FACS (ALDEFLUOR™-Kit)

Zur Quantifizierung von ALDH-Aktivität in lebenden Tumorzellen wurden *ALDEFLUOR™ Kits* (Stemcell Technologies Inc., Katalognummer: 01700) nach Protokoll des Herstellers eingesetzt. Dieses Protokoll wurde für den Nachweis kolorektaler primärer CSCs auf eine Zellkonzentration von 2×10^5 Zellen sowie 30 Minuten Inkubationszeit optimiert. Für die statistische Auswertung wurde in Quadruplikaten gearbeitet. Dabei basiert das *ALDEFLUOR™ Kit* auf der ALDH-Aktivität von lebenden Zellen, deshalb wurden tote Tumorzellen direkt vor der Messung mit Hilfe von $1 \mu\text{g/ml}$ *PI Solution* (Sigma-Aldrich, Katalognummer: P4864) markiert. Messungen erfolgten an einem *Accuri C6 flow cytometer* von *Becton, Dickinson and Company* nach Anleitung des *ALDEFLUOR™ Kits*. Für Auswertungen wurde eine zugehörige *C-Flow Plus Software* verwendet und PI-positive Zellen aus den Ergebnissen herausgenommen.

Um ALDH-positive von ALDH-negativen Tumorzellen für weitere funktionelle Untersuchungen zu trennen, wurde eine Sortierung der im *ALDEFLUOR™ Kit* markierten Tumorzellen mittels FACS-Technik durchgeführt. Dies erfolgte in einer Kooperation mit der „*Flow Cytometry Core Unit*“ der TUM unter Leitung von Herrn Dr. Matthias Schiemann. Dafür wurde ein *FACS Aria Cell Sorter* von *Becton, Dickinson and Company* verwendet. Da kolorektale Tumorzellpopulationen eine sehr heterogene ALDH Aktivität zeigen, wurden jeweils die 5% einer Gesamtpopulation mit der höchsten ALDH-Aktivität sowie ALDH-negative Tumorzellen heraussortiert.

5.11 TCF-Reporter-Assay (TOP-flash)

Zur Bestimmung eines aktivierten Wnt-Signalweges wurden kolorektale Tumorzelllinien mit Luciferasereporter-Plasmiden transfiziert. Diese Transfektionen wurden mit Hilfe des *Fugene6 Transfection Reagents* (Roche Applied Science, Katalognummer: 1814443) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden *phRL-TK TBE mut* mit *Super 8x TOPFlash* (Addgene-Plasmid: 12456) verwendet und als FOP-Flash Kontrolle *phRL-TK TBE mut* mit *Super 8x FOPFlash* (Addgene-Plasmid 12457). Es wurden je 2,4µg *Firefly-Luciferase* Plasmide mit 0,8µg *Renilla-Luciferase* Plasmide gemischt und im Verhältnis 1:4 mit *Fugene6 Transfection Reagent* eingesetzt. Für eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde in Quadruplikaten gearbeitet. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden Luciferaseaktivitäten mittels *Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems* (Promega Corporation, Katalognummer: E1910) nach Anleitung des Herstellers detektiert. Für diese Messungen wurde ein *Orion II Microplate Luminometer* von *Berthold Detection Systems* verwendet und TOP-Flash Messwerte auf FOP-Flash Messwerte normiert.

5.12 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Färbungen wurden 2µm dicke Schnitte von FFPE-Tumorgewebe eingesetzt. Die Färbungen erfolgten mittels *ultraView Universal DAB Detection Kits* auf einem *BenchMark XT automated slide preparation system* von *Ventana Medical Systems Inc.* (Roche Diagnostic). Dazu wurden anti-CDX2 (BioGenex, Klon: CDX2-88, Verdünnung: 1:200), anti-KRT7 (Progen, Klon: Ks7.18, Verdünnung: 1:200) und anti-KRT20 (Progen, Klon: IT-Ks 20.8, Verdünnung: 1:300) eingesetzt. Zur histopathologischen Klassifizierung des Tumorgewebes wurde zusätzlich je ein HE-Schnitt angefertigt. Herr Dr. Dr. med. Jens Neumann (Facharzt für Pathologie) erstellte die Befunde zu den IHC-Ergebnissen.

5.13 Pyrosequenzierung (hotspot mutation regions)

Die Gene BRAF, KRAS und NRAS besitzen *hotspot mutation regions*, die durch bekannte Pyrosequenzierungs-Techniken im Hinblick auf DNA-Mutationen analysiert wurden (Ogino et al., 2005, Poehlmann et al., 2007)). Dazu wurden *PyroMark Gold*

Q24 Reagents (Qiagen, Katalognummer: 970802) und ein *PyroMark Q24* von Qiagen sowie Primer (**TAB. 6**) nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Pyrosequenzierungsergebnisse wurden mittels der *PyroMark Q24 Software* (Qiagen) ausgewertet.

TABELLE 6: PRIMER FÜR PYROSEQUENZIERUNG (nach (Ogino et al., 2005; Poehlmann et al., 2007))

Genname	Primer	Primersequenz
BRAF_Exon11	forward	BIO-CAGTGGGACAAAGAATTGGATCTG
	reverse	CCATGCCACTTTCCTTGTAGA
	sequencing	ACTTTCCTTGTAGACTGT
BRAF_Exon15	forward	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG
	reverse	BIO-TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT
	sequencing	GTAAAAATAGGTGATTTTGG
KRAS_Codon12	forward	NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA
	reverse	BIO-TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT
	sequencing	TGTGGTAGTTGGAGCT
KRAS_Codon13	forward	BIO-TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG
	reverse	TCGTCCACAAAATGATTCTGA
	sequencing	GCACTCTTGCCTACG
NRAS_Exon3	forward	CTTGCTGGTGTGAAATGACTGAG
	reverse	BIO-TGGATTGTCAGTGCGCTTTT
	sequencing	TGGTGGTGGTTGGAG
CIMP_CAGNAG1	forward	GAAGGATATGGGTTATAGAT
	reverse	BIO-CTACTTAAACCAAAACAACC
	sequencing	GAAGGATATGGGTTATAGAT
CIMP_MGMT	forward	gGGATAGTTGGGATAGTT
	reverse	BIO-ATTTGGTGAGTGTGTTGGG
	sequencing	GGATATGTTGGGATAGT
CIMP_MLH1	forward	GGTATTTTGTGTTTTATTGGTT
	reverse	BIO-ACTCTATAAATTACTAAATCTCTT
	sequencing	AAAAAAGAATTAATAGGAA
CIMP_LINE1	forward	TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA
	reverse	BIO-AAAATCAAAAAATTCCCTTTC
	sequencing	AGTTAGGTGTGGGATAGT
CIMP_RUNX	forward	GGGTAGTAYGGAGTAGAGGAAGTTGG
	reverse	BIO-ACCTCCCTCCCRACCTTCC
	sequencing	GTGGTTAGTTAGTAAGTTTATTAT
CIMP_SOCS1	forward	GTGGGTATTTTTTGGTG
	reverse	BIO-ACTACCATCCAAATAAAAAAC
	sequencing	TGGGTATTTTTTGGTG

BIO – Biotin Label am 5'-Primerende

5.14 Sanger-Sequenzierung

Zum Nachweis von DNA-Mutationen im APC-, AXIN- und CTNNB1-Gen wurden beschriebene Sanger-Sequenzierungstechniken eingesetzt (Scheel et al., 2010). Für APC wurden zwei MCRs beschrieben, die erste von c.2237 bis c.2859 (Huang et al., 1996) die zweite von c.3887 bis c.4848 (Bienz, 2002). Dabei wird die erste MCR mittels überlappender Fragmente der Primersequenzen APC-I bis APC-IV abgedeckt und die zweite MCR über APC-1 bis APC-5. Für Axin und CTNNB1 wurden keine überlappenden Primer verwendet (**TAB. 7**). Sequenzierungen wurden mittels *GeneScan™ - 500 LIZ® Size Standards* (Life Technologies, Katalognummer: 4322682) und einem *3130 Genetic Analyzer* von *Applied Biosystems* (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe der *GeneMapper® Software* von *Applied Biosystems* (Life Technologies) ausgewertet.

TABELLE 7: PRIMER FÜR SANGER-SEQUENZIERUNG (nach (Scheel et al., 2010))

Genname	PCR	Primer	Primersequenz
APC-I	Outer	forward	GCTCAAGCTTGCCATCTCTT
		reverse	TGAAGAGGAGCTGGGTAACA
	Nested	forward	GTA AACGACGGCCAGTGCTCAAGCTTGCCATCTCTTCATG
		reverse	TAATACGACTCACTATAGGTGAAGAGGAGCTGGGTAACACTGT
	Sequencing	forward	GTA AACGACGGCCAGT
		reverse	TAATACGACTCACTATAGG
APC-II	Outer	forward	CTGGCAACATGACTGTCCTT
		reverse	TGAGAGGTATGAATGGCTGACA
	Nested	forward	GTA AACGACGGCCAGTCTGGCAACATGACTGTCCTTTTAC
		reverse	TAATACGACTCACTATAGGTGAGAGGTATGAATGGCTGACACTT
	Sequencing	forward	GTA AACGACGGCCAGT
		reverse	TAATACGACTCACTATAGG
APC-III	Outer	forward	TTTG CAGATCTCCACCACTG
		reverse	TTTGGCATAAGGCATAGAACA
	Nested	forward	GTA AACGACGGCCAGTTTTCAGATCTCCACCACTGCAG
		reverse	TAATACGACTCACTATAGGTTTGGCATAAGGCATAGAACATGTCCTA
	Sequencing	forward	GTA AACGACGGCCAGT
		reverse	TAATACGACTCACTATAGG
APC-IV	Outer	forward	AAGAAGCTCTGCTGCCCATACACA
		reverse	TAGGTCGGCTGGGTATTGAC
	Nested	forward	GTA AACGACGGCCAGTAAGAAGCTCTGCTGCCCATACACA
		reverse	TAATACGACTCACTATAGGTAGGTCGGCTGGGTATTGACCATA
	Sequencing	forward	GTA AACGACGGCCAGT
		reverse	TAATACGACTCACTATAGG

APC-1	Outer	forward	CAGATTCTGCTAATACCCTGC
		reverse	CTAAACATGAGTGGGGTCTC
	Nested	forward	CAGATTCTGCTAATACCCTGCAAATAGCAG
		reverse	CTAAACATGAGTGGGGTCTCCTGAAC
	Sequencing	forward	CAGATTCTGCTAATACCCTGCAAATAGCAGAAAT
		reverse	TAAACATGAGTGGGGTCTCCTGAACATAG
APC-2	Outer	forward	CTTCAGGAGCGAAATCTCC
		reverse	AGGTGGTGGAGGTGTTTTAC
	Nested	forward	TTCAGGAGCGAAATCTCCCTCC
		reverse	AGGTGGTGGAGGTGTTTTACTTC
	Sequencing	forward	CAGGAGCGAAATCTCCCTCCAAAAG
		reverse	AGGTGGTGGAGGTGTTTTACTTCTGCT
APC-3	Outer	forward	CCCAGTGATCTTCAGATAG
		reverse	CAAGAAAATCCATCTGGAGTAC
	Nested	forward	CCCAGTGATCTTCAGATAGCCC
		reverse	CAAGAAAATCCATCTGGAGTACTTTCCG
	Sequencing	forward	CAGTGATCTTCAGATAGCCCTGGA
		reverse	AAGAAAATCCATCTGGAGTACTTTCCGTGG
APC-4	Outer	forward	GGTTCTTCAGATGCTGATAC
		reverse	TAATAGGTCCTTTTCAGAATCAATAG
	Nested	forward	GGTTCTTCAGATGCTGATACTTTATTAC
		reverse	TAATAGGTCCTTTTCAGAATCAATAGTTTTTCTG
	Sequencing	forward	GGTTCTTCAGATGCTGATACTTTATTACATT
		reverse	TAATAGGTCCTTTTCAGAATCAATAGTTTTTCTGCCT
APC-5	Outer	forward	CAGAATCAGAGCAGCCTAAAG
		reverse	TTTGTACACAGGCAGCTGAC
	Nested	forward	CAGAATCAGAGCAGCCTAAAGAATC
		reverse	TTTGTACACAGGCAGCTGACTTG
	Sequencing	forward	CAGAATCAGAGCAGCCTAAAGAATCAAATG
		reverse	TTTGTACACAGGCAGCTGACTTGGTTTC
AXIN2	Outer	forward	CCTACCCCTTGGAGTCTGC
		reverse	GGACCCCTTCACTTCCACTCA
	Nested	forward	GTA AACGACGGCCAGTCTACCCCTTGGAGTCTGC
		reverse	TAATACGACTCACTATAGGGCCTCAACCTAGGACCCTTC
	Sequencing	forward	GTA AACGACGGCCAGT
		reverse	TAATACGACTCACTATAGG
CTNNB1	Outer	forward	CTGACTTTCAGTAAGGCAATG
		reverse	TAATACTCTTACCAGCTACTTG
	Nested	forward	GTA AACGACGGCCAGTGCCAATCTACTAATGCTAATACT
		reverse	TAATACGACTCACTATAGGTAATACTCTTACCAGCTACTTG
	Sequencing	forward	GTA AACGACGGCCAGT
		reverse	TAATACGACTCACTATAGG
MSI_BAT25	Sequencing	forward	FAM-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT
		reverse	TCTGCATTTTAACTATGGCTC

MSI_BAT26	Sequencing	forward	TET-TGACTACTTTTGACTTCAGCC
		reverse	AACCATTC AACATTTTAAACCC

FAM – 6-Carboxyfluorescein Label am 5'-Primerende

TET – 6-carboxy-1,4-dichloro-2',7'-dichloro-fluorescein Label am 5'-Primerende

5.15 In vitro Ausformung von Sphäroiden

Untersuchungen zur Ausformungskapazität von Sphäroiden in kolorektalen Primär-Tumorzelllinien erfolgten im Einklang mit bereits beschriebenen Arbeiten (Ricci-Vitiani et al., 2007; Todaro et al., 2007). Um CSC-Frequenzen innerhalb der Tumorzelllinien zu bestimmen, wurden *Extreme Limiting Dilution Analysis* (ELDA) genutzt. Dazu wurden Verdünnungsreihen aus Einzelzellen (1, 10, 100, 500, 1.000, 5.000 und 10.000 Zellen pro Napf) in 96-Napf Platten eingesetzt und unter nicht adhärenenten Kulturbedingungen inkubiert. Für eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde in Quadruplikaten gearbeitet. Nach etwa sechs bis neun Tagen wurde die Sphäroidbildung fotografisch dokumentiert und die CSC-Frequenzen mittels der online ELDA-Software des WEHI (*Walter and Eliza Hall institute*) bestimmt.

5.16 Tumorigenität in NOD/SCID-Mäusen

Zur Bestimmung der Tumorigenität von kolorektalen Primär-Tumorzelllinien wurde deren Wachstum als Xeno-Transplantate in immundefizienten Mäusen untersucht (O'Brien et al., 2007; Todaro et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Dalerba et al., 2007). Um dabei die CSC-Frequenzen der Primär-Tumorzelllinien zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen (12.500, 25.000, 50.000, 100.000 und 200.000 Zellen pro Injektion) generiert. Um diese Zellsuspensionen einerseits am Injektionsort zu fixieren und um andererseits eine komplexe extrazelluläre Umgebung zu präsentieren, wurde Matrigel™ (BD Biosciences, Katalognummer: 356234) eingesetzt. Jeder Verdünnungsschritt wurde zu gleichen Teilen mit Matrigel™ gemischt. Für eine statistische Auswertung der Tierversuche wurde in Gruppen zu sechs Tieren gearbeitet. Vor den Injektionen wurden weibliche NOD/SCID-Mäuse im Alter von sechs bis neun Wochen mittels Inhalations-Narkose (Isofloran) betäubt. Die Injektionen wurden subkutan in die dorsalen Flanken der Tiere gesetzt. In Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der verwendeten Primär-Tumorzelllinie konnten die Versuche nach circa fünf bis neun Wochen beendet werden. Dabei bestimmte das schnellere

Tumorstadium in den Kontrollgruppen verglichen mit den Versuchsgruppen (BMI1-Knockdown) den Abbruchzeitpunkt. Dazu wurde die Tumorigenität der injizierten Xeno-Transplantate überprüft und die entstandenen Tumore entnommen. Diese Tumore wurden gewogen, fotografisch dokumentiert und als FFPE-Gewebe konserviert. Die CSC-Frequenz der eingesetzten Primär-Tumorzelllinien wurde mit Hilfe der online Software des WEHI bestimmt.

5.17 Metastasierung in NOD/SCID-Mäusen

Zur Bestimmung der Metastasierungsfähigkeit von kolorektalen Tumorzellen wurden die Versuche wie beschrieben durchgeführt (Jackstadt et al., 2013). In diesem Metastasenmodell wurden Injektionen in die Schwanzvene von immundefizienten Mäusen eingesetzt, um eine Metastasenbildung in den Lungen zu untersuchen. Die experimentelle Umsetzung erfolgte in Kooperation mit Rene Jackstadt, Arbeitsgruppe „Experimentelle und Molekulare Pathologie“ (Prof. Dr. Heiko Hermeking) des Pathologischen Instituts der LMU. Aufgrund seiner Erfahrung mit diesem Metastasenmodell wurden die Experimente maßgeblich von ihm durchgeführt. Für die Experimente wurde die kolorektale Tumorzelllinie SW620-luc eingesetzt, die konstitutiv Luciferase exprimiert, sodass diese mit Hilfe eines *in vivo imaging* Systems im lebenden Tier nachgewiesen werden kann. Diese Zelllinie wurde von Prof. Dr. Heiko Hermeking zur Verfügung gestellt. In den Versuchen wurden weibliche NOD/SCID-Mäuse im Alter von sechs bis neun Wochen eingesetzt. Für eine statistische Auswertung der Tierversuche wurde in Gruppen zu acht Tieren gearbeitet. Nach circa neun Wochen konnten die Versuche beendet werden. Dazu wurde die mittels Biolumineszenz aufgezeichnete Metastasenbildung in den Lungen überprüft sowie die Lungen entnommen, fotografiert und als FFPE-Gewebe konserviert.

5.18 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in Multiplikaten durchgeführt, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurden. Dabei ermöglichten Referenzmessungen die Normierung der Messwerte. Unterschiede zwischen Messwerten zweier Versuchsgruppen wurden, unter Annahme einer Normalverteilung, mittels eines zweiseitigen t-Tests auf statistische Signifikanz getestet. Dabei wurde das maximal zulässi-

ge Signifikanzniveau auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Damit beträgt die Wahrscheinlichkeit, Unterschiede korrekt als signifikant zu bestätigen, mindestens 95%.

6. Literaturverzeichnis

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 834-846.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 3983-3988.

Alonso-Camino, V., Santos-Valle, P., Ispizua, M.C., Sanz, L., and Alvarez-Vallina, L. (2011). Engineered human tumor xenografts with functional human vascular networks. *Microvasc. Res.* 81, 18-25.

Anderson, E.C., Hessman, C., Levin, T.G., Monroe, M.M., and Wong, M.H. (2011a). The Role of Colorectal Cancer Stem Cells in Metastatic Disease and Therapeutic Response. *Cancers. (Basel)* 3, 319-339.

Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F.W., Bateman, C.M., Guo, Y., Colman, S.M., Kempinski, H., Moorman, A.V., Titley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T., and Greaves, M. (2011b). Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 469, 356-361.

Bacelli, I. and Trumpp, A. (2012). The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J. Cell Biol.* 198, 281-293.

Baldus, S.E., Schaefer, K.L., Engers, R., Hartleb, D., Stoecklein, N.H., and Gabbert, H.E. (2010). Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin. Cancer Res.* 16, 790-799.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.

Bapat, S.A., Mali, A.M., Koppikar, C.B., and Kurrey, N.K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 65, 3025-3029.

Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., and Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.

Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., Pratesi, G., Fabbri, A., Andriani, F., Tinelli, S., Roz, E., Caserini, R., Lo, V.S., Camerini, T., Mariani, L., Delia, D., Calabro, E., Pastorino, U., and Sozzi, G. (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 16281-16286.

Bienz, M. (2002). The subcellular destinations of APC proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 328-338.

Bienz, M. and Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103, 311-320.

Bissell, M.J. and Labarge, M.A. (2005). Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell* 7, 17-23.

Blagosklonny, M.V. (2006). Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. *Leukemia* 20, 385-391.

Bock, C. and Lengauer, T. (2012). Managing drug resistance in cancer: lessons from HIV therapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 494-501.

Boiani, M. and Scholer, H.R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 872-884.

Bommi, P.V., Dimri, M., Sahasrabudhe, A.A., Khandekar, J., and Dimri, G.P. (2010). The polycomb group protein BMI1 is a transcriptional target of HDAC inhibitors. *Cell Cycle* 9, 2663-2673.

Bonnet, D. and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730-737.

Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10356-10361.

Brabletz, T., Jung, A., Hermann, K., Gunther, K., Hohenberger, W., and Kirchner, T. (1998). Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol. Res. Pract.* 194, 701-704.

Bracht, K., Nicholls, A.M., Liu, Y., and Bodmer, W.F. (2010). 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *Br. J. Cancer* 103, 340-346.

Bruggeman, S.W., Hulsman, D., Tanger, E., Buckle, T., Blom, M., Zevenhoven, J., van, T.O., and van, L.M. (2007). Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma. *Cancer Cell* 12, 328-341.

Brunk, B.P., Martin, E.C., and Adler, P.N. (1991). Drosophila genes Posterior Sex Combs and Suppressor two of zeste encode proteins with homology to the murine bmi-1 oncogene. *Nature* 353, 351-353.

Cao, L., Bombard, J., Cintron, K., Sheedy, J., Weetall, M.L., and Davis, T.W. (2011a). BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer. *J. Cell Biochem.* 112, 2729-2741.

Cao,L., Bombard,J., Cintron,K., Sheedy,J., Weetall,M.L., and Davis,T.W. (2011b). BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer. *J. Cell Biochem.* 112, 2729-2741.

Cao,R. and Zhang,Y. (2004). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol. Cell* 15, 57-67.

Charafe-Jauffret,E., Ginestier,C., Iovino,F., Wicinski,J., Cervera,N., Finetti,P., Hur,M.H., Diebel,M.E., Monville,F., Dutcher,J., Brown,M., Viens,P., Xerri,L., Bertucci,F., Stassi,G., Dontu,G., Birnbaum,D., and Wicha,M.S. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* 69, 1302-1313.

Chen,J., Huang,X.F., and Katsifis,A. (2010). Activation of signal pathways and the resistance to anti-EGFR treatment in colorectal cancer. *J. Cell Biochem.* 111, 1082-1086.

Chiba,T., Seki,A., Aoki,R., Ichikawa,H., Negishi,M., Miyagi,S., Oguro,H., Saraya,A., Kamiya,A., Nakauchi,H., Yokosuka,O., and Iwama,A. (2010). Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and - independent manners in mice. *Hepatology* 52, 1111-1123.

Cho,J.H., Dimri,M., and Dimri,G.P. (2013). A Positive Feedback Loop Regulates the Expression of Polycomb Group Protein BMI1 via WNT Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 3406-3418.

Christofori,G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature* 441, 444-450.

Clevers,H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* 17, 313-319.

Collins,A.T., Berry,P.A., Hyde,C., Stower,M.J., and Maitland,N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65, 10946-10951.

Cui,H., Hu,B., Li,T., Ma,J., Alam,G., Gunning,W.T., and Ding,H.F. (2007). Bmi-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Am. J. Pathol.* 170, 1370-1378.

Curtis,C., Shah,S.P., Chin,S.F., Turashvili,G., Rueda,O.M., Dunning,M.J., Speed,D., Lynch,A.G., Samarajiwa,S., Yuan,Y., Graf,S., Ha,G., Haffari,G., Bashashati,A., Russell,R., McKinney,S., Langerod,A., Green,A., Provenzano,E., Wishart,G., Pinder,S., Watson,P., Markowitz,F., Murphy,L., Ellis,I., Purushotham,A., Borresen-Dale,A.L., Brenton,J.D., Tavaré,S., Caldas,C., and Aparicio,S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486, 346-352.

Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., Shelton, A.A., Parmiani, G., Castelli, C., and Clarke, M.F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 10158-10163.

Damiano, V., Caputo, R., Garofalo, S., Bianco, R., Rosa, R., Merola, G., Gelardi, T., Racioppi, L., Fontanini, G., De, P.S., Kandimalla, E.R., Agrawal, S., Ciardiello, F., and Tortora, G. (2007). TLR9 agonist acts by different mechanisms synergizing with bevacizumab in sensitive and cetuximab-resistant colon cancer xenografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 12468-12473.

Dang, D.T., Mahatan, C.S., Dang, L.H., Agboola, I.A., and Yang, V.W. (2001). Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. *Oncogene* 20, 4884-4890.

Darzynkiewicz, Z. and Huang, X. (2004). Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 5*, Unit.

de la Chapelle, A. (2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 769-780.

de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., Koseki, H., and Brockdorff, N. (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell* 7, 663-676.

Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 275-284.

Decaudin, D. (2011). Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer. *Anticancer Drugs* 22, 827-841.

Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.

Dieter, S.M., Ball, C.R., Hoffmann, C.M., Nowrouzi, A., Herbst, F., Zavidij, O., Abel, U., Arens, A., Weichert, W., Brand, K., Koch, M., Weitz, J., Schmidt, M., von, K.C., and Glimm, H. (2011). Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell* 9, 357-365.

Dimri, G.P., Martinez, J.L., Jacobs, J.J., Keblusek, P., Itahana, K., van, L.M., Campisi, J., Wazer, D.E., and Band, V. (2002). The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 62, 4736-4745.

Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., and Wicha, M.S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 17, 1253-1270.

Douville, J., Beaulieu, R., and Balicki, D. (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 18, 17-25.

Du,J., Li,Y., Li,J., and Zheng,J. (2010). Polycomb group protein Bmi1 expression in colon cancers predicts the survival. *Med. Oncol.* 27, 1273-1276.

Edwards,M.S., Chadda,S.D., Zhao,Z., Barber,B.L., and Sykes,D.P. (2012). A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 14, e31-e47.

Essers,M.A. and Trumpp,A. (2010). Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Mol. Oncol.* 4, 443-450.

Essers,M.A., Offner,S., Blanco-Bose,W.E., Waibler,Z., Kalinke,U., Duchosal,M.A., and Trumpp,A. (2009). IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904-908.

Fan,F., Samuel,S., Evans,K.W., Lu,J., Xia,L., Zhou,Y., Sceusi,E., Tozzi,F., Ye,X.C., Mani,S.A., and Ellis,L.M. (2012). Overexpression of Snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med.* 1, 5-16.

Fan,C., He,L., Kapoor,A., Gillis,A., Rybak,A.P., Cutz,J.C., and Tang,D. (2008). Bmi1 promotes prostate tumorigenesis via inhibiting p16(INK4A) and p14(ARF) expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 642-648.

Fang,D., Nguyen,T.K., Leishear,K., Finko,R., Kulp,A.N., Hotz,S., Van Belle,P.A., Xu,X., Elder,D.E., and Herlyn,M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65, 9328-9337.

Farcas,A.M., Blackledge,N.P., Sudbery,I., Long,H.K., McGouran,J.F., Rose,N.R., Lee,S., Sims,D., Cerase,A., Sheahan,T.W., Koseki,H., Brockdorff,N., Ponting,C.P., Kessler,B.M., and Klose,R.J. (2012). KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *Elife.* 1, e00205.

Fevr,T., Robine,S., Louvard,D., and Huelsken,J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell Biol.* 27, 7551-7559.

Fischle,W., Wang,Y., Jacobs,S.A., Kim,Y., Allis,C.D., and Khorasanizadeh,S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870-1881.

Frank,N.Y., Schatton,T., and Frank,M.H. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J. Clin. Invest* 120, 41-50.

Fridman,R., Benton,G., Aranoutova,I., Kleinman,H.K., and Bonfil,R.D. (2012). Increased initiation and growth of tumor cell lines, cancer stem cells and biopsy material in mice using basement membrane matrix protein (Cultrex or Matrigel) co-injection. *Nat. Protoc.* 7, 1138-1144.

- Gao,Z., Zhang,J., Bonasio,R., Strino,F., Sawai,A., Parisi,F., Kluger,Y., and Reinberg,D. (2012). PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol. Cell* 45, 344-356.
- Gibbs,K.D., Jr., Jager,A., Crespo,O., Goltsev,Y., Trejo,A., Richard,C.E., and Nolan,G.P. (2012). Decoupling of tumor-initiating activity from stable immunophenotype in HoxA9-Meis1-driven AML. *Cell Stem Cell* 10, 210-217.
- Ginestier,C., Hur,M.H., Charafe-Jauffret,E., Monville,F., Dutcher,J., Brown,M., Jacquemier,J., Viens,P., Kleer,C.G., Liu,S., Schott,A., Hayes,D., Birnbaum,D., Wicha,M.S., and Dontu,G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555-567.
- Glinsky,G.V. (2007). Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Rev.* 3, 79-93.
- Glinsky,G.V., Berezovska,O., and Glinskii,A.B. (2005). Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J. Clin. Invest* 115, 1503-1521.
- Goel,A. and Boland,C.R. (2012). Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology* 143, 1442-1460.
- Gregorieff,A. and Clevers,H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* 19, 877-890.
- Guo,B.H., Feng,Y., Zhang,R., Xu,L.H., Li,M.Z., Kung,H.F., Song,L.B., and Zeng,M.S. (2011). Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. *Mol. Cancer* 10, 10.
- Guo,W.J., Datta,S., Band,V., and Dimri,G.P. (2007). Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins. *Mol. Biol. Cell* 18, 536-546.
- Gupta,P.B., Onder,T.T., Jiang,G., Tao,K., Kuperwasser,C., Weinberg,R.A., and Lander,E.S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138, 645-659.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Haupt,Y., Alexander,W.S., Barri,G., Klinken,S.P., and Adams,J.M. (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 65, 753-763.

He,J., Shen,L., Wan,M., Taranova,O., Wu,H., and Zhang,Y. (2013). Kdm2b maintains murine embryonic stem cell status by recruiting PRC1 complex to CpG islands of developmental genes. *Nat. Cell Biol.* 15, 373-384.

Heinemann,V., Douillard,J.Y., Ducreux,M., and Peeters,M. (2013). Targeted therapy in metastatic colorectal cancer - An example of personalised medicine in action. *Cancer Treat. Rev.*

Hermann,P.C., Huber,S.L., Herrler,T., Aicher,A., Ellwart,J.W., Guba,M., Bruns,C.J., and Heeschen,C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313-323.

Hoenerhoff,M.J., Chu,I., Barkan,D., Liu,Z.Y., Datta,S., Dimri,G.P., and Green,J.E. (2009). BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene* 28, 3022-3032.

Hollier,B.G., Tinnirello,A.A., Werden,S.J., Evans,K.W., Taube,J.H., Sarkar,T.R., Sphyris,N., Shariati,M., Kumar,S.V., Battula,V.L., Herschkowitz,J.I., Guerra,R., Chang,J.T., Miura,N., Rosen,J.M., and Mani,S.A. (2013). FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer. *Cancer Res.* 73, 1981-1992.

Honig,A., Weidler,C., Hausler,S., Krockenberger,M., Buchholz,S., Koster,F., Segerer,S.E., Dietl,J., and Engel,J.B. (2010). Overexpression of polycomb protein BMI-1 in human specimens of breast, ovarian, endometrial and cervical cancer. *Anticancer Res.* 30, 1559-1564.

Hosen,N., Yamane,T., Muijtjens,M., Pham,K., Clarke,M.F., and Weissman,I.L. (2007). Bmi-1-green fluorescent protein-knock-in mice reveal the dynamic regulation of bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells. *Stem Cells* 25, 1635-1644.

Huang,E.H., Hynes,M.J., Zhang,T., Ginestier,C., Dontu,G., Appelman,H., Fields,J.Z., Wicha,M.S., and Boman,B.M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 3382-3389.

Huang,J., Papadopoulos,N., McKinley,A.J., Farrington,S.M., Curtis,L.J., Wyllie,A.H., Zheng,S., Willson,J.K., Markowitz,S.D., Morin,P., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., and Dunlop,M.G. (1996). APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9049-9054.

Ito,K., Bernardi,R., Morotti,A., Matsuoka,S., Saglio,G., Ikeda,Y., Rosenblatt,J., Avigan,D.E., Teruya-Feldstein,J., and Pandolfi,P.P. (2008). PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* 453, 1072-1078.

Jackstadt,R., Roh,S., Neumann,J., Jung,P., Hoffmann,R., Horst,D., Berens,C., Bornkamm,G.W., Kirchner,T., Menssen,A., and Hermeking,H. (2013). AP4 is a

mediator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer. *J. Exp. Med.* 210, 1331-1350.

Jacobs,J.J., Kieboom,K., Marino,S., DePinho,R.A., and van,L.M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397, 164-168.

Jung,J.W., Lee,S., Seo,M.S., Park,S.B., Kurtz,A., Kang,S.K., and Kang,K.S. (2010). Histone deacetylase controls adult stem cell aging by balancing the expression of polycomb genes and jumonji domain containing 3. *Cell Mol. Life Sci.* 67, 1165-1176.

Kanno,M., Hasegawa,M., Ishida,A., Isono,K., and Taniguchi,M. (1995). *mel-18*, a Polycomb group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity. *EMBO J.* 14, 5672-5678.

Kelly,P.N., Dakic,A., Adams,J.M., Nutt,S.L., and Strasser,A. (2007). Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 317, 337.

Ketel,C.S., Andersen,E.F., Vargas,M.L., Suh,J., Strome,S., and Simon,J.A. (2005). Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. *Mol. Cell Biol.* 25, 6857-6868.

Kim,J., Hwangbo,J., and Wong,P.K. (2011). p38 MAPK-Mediated Bmi-1 down-regulation and defective proliferation in ATM-deficient neural stem cells can be restored by Akt activation. *PLoS. One.* 6, e16615.

Kim,B.N., Yamamoto,H., Ikeda,K., Damdinsuren,B., Sugita,Y., Ngan,C.Y., Fujie,Y., Ogawa,M., Hata,T., Ikeda,M., Ohue,M., Sekimoto,M., Monden,T., Matsuura,N., and Monden,M. (2005). Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues. *Int. J. Oncol.* 26, 1217-1226.

Kim,J.H., Yoon,S.Y., Kim,C.N., Joo,J.H., Moon,S.K., Choe,I.S., Choe,Y.K., and Kim,J.W. (2004). The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett.* 203, 217-224.

Kong,Y., Yoshida,S., Saito,Y., Doi,T., Nagatoshi,Y., Fukata,M., Saito,N., Yang,S.M., Iwamoto,C., Okamura,J., Liu,K.Y., Huang,X.J., Lu,D.P., Shultz,L.D., Harada,M., and Ishikawa,F. (2008). CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 22, 1207-1213.

Korinek,V., Barker,N., Moerer,P., van,D.E., Huls,G., Peters,P.J., and Clevers,H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* 19, 379-383.

Kreso,A., O'Brien,C.A., van,G.P., Gan,O.I., Notta,F., Brown,A.M., Ng,K., Ma,J., Wienholds,E., Dunant,C., Pollett,A., Gallinger,S., McPherson,J., Mullighan,C.G.,

Shibata,D., and Dick,J.E. (2013). Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* 339, 543-548.

Kreso,A. and O'Brien,C.A. (2008). Colon cancer stem cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol. Chapter 3*, Unit.

Kruger,J.A., Kaplan,C.D., Luo,Y., Zhou,H., Markowitz,D., Xiang,R., and Reisfeld,R.A. (2006). Characterization of stem cell-like cancer cells in immune-competent mice. *Blood* 108, 3906-3912.

Lapidot,T., Sirard,C., Vormoor,J., Murdoch,B., Hoang,T., Caceres-Cortes,J., Minden,M., Paterson,B., Caligiuri,M.A., and Dick,J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.

Lazebnik,Y. (2010). What are the hallmarks of cancer? *Nat. Rev. Cancer* 10, 232-233.

Leeb,M. and Wutz,A. (2007). Ring1B is crucial for the regulation of developmental control genes and PRC1 proteins but not X inactivation in embryonic cells. *J. Cell Biol.* 178, 219-229.

Lessard,J. and Sauvageau,G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255-260.

Leung,C., Lingbeek,M., Shakhova,O., Liu,J., Tanger,E., Saremaslani,P., van,L.M., and Marino,S. (2004). Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428, 337-341.

Li,X., Yang,Z., Song,W., Zhou,L., Li,Q., Tao,K., Zhou,J., Wang,X., Zheng,Z., You,N., Dou,K., and Li,H. (2013). Overexpression of Bmi-1 contributes to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by increasing the expression of matrix metalloproteinase (MMP)2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor via the PTEN/PI3K/Akt pathway. *Int. J. Oncol.* 43, 793-802.

Li,D.W., Tang,H.M., Fan,J.W., Yan,D.W., Zhou,C.Z., Li,S.X., Wang,X.L., and Peng,Z.H. (2010a). Expression level of Bmi-1 oncoprotein is associated with progression and prognosis in colon cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 997-1006.

Li,J., Gong,L.Y., Song,L.B., Jiang,L.L., Liu,L.P., Wu,J., Yuan,J., Cai,J.C., He,M., Wang,L., Zeng,M., Cheng,S.Y., and Li,M. (2010b). Oncoprotein Bmi-1 renders apoptotic resistance to glioma cells through activation of the IKK-nuclear factor-kappaB Pathway. *Am. J. Pathol.* 176, 699-709.

Li,C., Lee,C.J., and Simeone,D.M. (2009). Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol. Biol.* 568, 161-173.

Li,S.K., Smith,D.K., Leung,W.Y., Cheung,A.M., Lam,E.W., Dimri,G.P., and Yao,K.M. (2008). FoxM1c counteracts oxidative stress-induced senescence and stimulates Bmi-1 expression. *J. Biol. Chem.* 283, 16545-16553.

Li,C., Heidt,D.G., Dalerba,P., Burant,C.F., Zhang,L., Adsay,V., Wicha,M., Clarke,M.F., and Simeone,D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030-1037.

Liang,Q., Li,L., Zhang,J., Lei,Y., Wang,L., Liu,D.X., Feng,J., Hou,P., Yao,R., Zhang,Y., Huang,B., and Lu,J. (2013). CDK5 is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Sci. Rep.* 3, 2932.

Liu,L., Andrews,L.G., and Tollefsbol,T.O. (2006). Loss of the human polycomb group protein BMI1 promotes cancer-specific cell death. *Oncogene* 25, 4370-4375.

Luis,N.M., Morey,L., Di,C.L., and Benitah,S.A. (2012). Polycomb in stem cells: PRC1 branches out. *Cell Stem Cell* 11, 16-21.

Mani,S.A., Guo,W., Liao,M.J., Eaton,E.N., Ayyanan,A., Zhou,A.Y., Brooks,M., Reinhard,F., Zhang,C.C., Shipitsin,M., Campbell,L.L., Polyak,K., Briskin,C., Yang,J., and Weinberg,R.A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.

Mantovani,A. (2009). Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 457, 36-37.

Margueron,R., Li,G., Sarma,K., Blais,A., Zavadil,J., Woodcock,C.L., Dynlacht,B.D., and Reinberg,D. (2008). Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol. Cell* 32, 503-518.

Martinez,A.M. and Cavalli,G. (2006). The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* 5, 1189-1197.

Merkerova,M., Bruchova,H., Kracmarova,A., Klamova,H., and Brdicka,R. (2007). Bmi-1 over-expression plays a secondary role in chronic myeloid leukemia transformation. *Leuk. Lymphoma* 48, 793-801.

Mihic-Probst,D., Kuster,A., Kilgus,S., Bode-Lesniewska,B., Ingold-Heppner,B., Leung,C., Storz,M., Seifert,B., Marino,S., Schraml,P., Dummer,R., and Moch,H. (2007). Consistent expression of the stem cell renewal factor BMI-1 in primary and metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 121, 1764-1770.

Misale,S., Yaeger,R., Hobor,S., Scala,E., Janakiraman,M., Liska,D., Valtorta,E., Schiavo,R., Buscarino,M., Siravegna,G., Bencardino,K., Cercek,A., Chen,C.T., Veronese,S., Zanon,C., Sartore-Bianchi,A., Gambacorta,M., Gallicchio,M., Vakiani,E., Boscaro,V., Medico,E., Weiser,M., Siena,S., Di,N.F., Solit,D., and Bardelli,A. (2012). Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486, 532-536.

Molenaar,M., van de Wetering,M., Oosterwegel,M., Peterson-Maduro,J., Godsave,S., Korinek,V., Roose,J., Destree,O., and Clevers,H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-399.

Molofsky,A.V., He,S., Bydon,M., Morrison,S.J., and Pardal,R. (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse

growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev.* 19, 1432-1437.

Molofsky,A.V., Pardal,R., Iwashita,T., Park,I.K., Clarke,M.F., and Morrison,S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962-967.

Montemayor-Garcia,C., Hardin,H., Guo,Z., Larrain,C., Buehler,D., Asioli,S., Chen,H., and Lloyd,R.V. (2013). The role of epithelial mesenchymal transition markers in thyroid carcinoma progression. *Endocr. Pathol.* 24, 206-212.

Moro,M., Bertolini,G., Tortoreto,M., Pastorino,U., Sozzi,G., and Roz,L. (2012). Patient-derived xenografts of non small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 568567.

Muto,T., Bussey,H.J., and Morson,B.C. (1975). The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36, 2251-2270.

Niwa,H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134, 635-646.

Nowak,K., Kerl,K., Fehr,D., Kramps,C., Gessner,C., Killmer,K., Samans,B., Berwanger,B., Christiansen,H., and Lutz,W. (2006). BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Res.* 34, 1745-1754.

O'Brien,C.A., Pollett,A., Gallinger,S., and Dick,J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110.

Odoux,C., Fohrer,H., Hoppe,T., Guzik,L., Stolz,D.B., Lewis,D.W., Gollin,S.M., Gamblin,T.C., Geller,D.A., and Lagasse,E. (2008). A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. *Cancer Res.* 68, 6932-6941.

Ogino,S., Kawasaki,T., Brahmandam,M., Yan,L., Cantor,M., Namgyal,C., Mino-Kenudson,M., Lauwers,G.Y., Loda,M., and Fuchs,C.S. (2005). Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J. Mol. Diagn.* 7, 413-421.

Oishi,N. and Wang,X.W. (2011). Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 517-535.

Pang,R., Law,W.L., Chu,A.C., Poon,J.T., Lam,C.S., Chow,A.K., Ng,L., Cheung,L.W., Lan,X.R., Lan,H.Y., Tan,V.P., Yau,T.C., Poon,R.T., and Wong,B.C. (2010). A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* 6, 603-615.

Pantel,K., Alix-Panabieres,C., and Riethdorf,S. (2009). Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 339-351.

Park,I.K., Morrison,S.J., and Clarke,M.F. (2004). Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J. Clin. Invest* 113, 175-179.

Pearce,D.J., Taussig,D., Simpson,C., Allen,K., Rohatiner,A.Z., Lister,T.A., and Bonnet,D. (2005). Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* 23, 752-760.

Pece,S., Tosoni,D., Confalonieri,S., Mazzarol,G., Vecchi,M., Ronzoni,S., Bernard,L., Viale,G., Pelicci,P.G., and Di Fiore,P.P. (2010). Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* 140, 62-73.

Poehlmann,A., Kuester,D., Meyer,F., Lippert,H., Roessner,A., and Schneider-Stock,R. (2007). K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol. Res. Pract.* 203, 489-497.

Potten,C.S., Gandara,R., Mahida,Y.R., Loeffler,M., and Wright,N.A. (2009). The stem cells of small intestinal crypts: where are they? *Cell Prolif.* 42, 731-750.

Pretlow,T.G., Wolman,S.R., Micale,M.A., Pelley,R.J., Kursh,E.D., Resnick,M.I., Bodner,D.R., Jacobberger,J.W., Delmoro,C.M., Giaconia,J.M., and . (1993). Xenografts of primary human prostatic carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 394-398.

Raaphorst,F.M. (2005). Deregulated expression of Polycomb-group oncogenes in human malignant lymphomas and epithelial tumors. *Hum. Mol. Genet.* 14 Spec No 1, R93-R100.

Raimondi,C., Gianni,W., Cortesi,E., and Gazzaniga,P. (2010). Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: revisiting minimal residual disease. *Curr. Cancer Drug Targets.* 10, 496-508.

Reinisch,C., Kandutsch,S., Uthman,A., and Pammer,J. (2006). BMI-1: a protein expressed in stem cells, specialized cells and tumors of the gastrointestinal tract. *Histol. Histopathol.* 21, 1143-1149.

Reya,T., Morrison,S.J., Clarke,M.F., and Weissman,I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

Ricci-Vitiani,L., Lombardi,D.G., Pilozzi,E., Biffoni,M., Todaro,M., Peschle,C., and De,M.R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115.

Rosenbluh,J., Nijhawan,D., Cox,A.G., Li,X., Neal,J.T., Schafer,E.J., Zack,T.I., Wang,X., Tsherniak,A., Schinzel,A.C., Shao,D.D., Schumacher,S.E., Weir,B.A., Vazquez,F., Cowley,G.S., Root,D.E., Mesirov,J.P., Beroukhim,R., Kuo,C.J., Goessling,W., and Hahn,W.C. (2012). beta-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* 151, 1457-1473.

Roychowdhury,S., Iyer,M.K., Robinson,D.R., Lonigro,R.J., Wu,Y.M., Cao,X., Kalyana-Sundaram,S., Sam,L., Balbin,O.A., Quist,M.J., Barrette,T., Everett,J., Siddiqui,J., Kunju,L.P., Navone,N., Araujo,J.C., Troncoso,P., Logothetis,C.J., Innis,J.W., Smith,D.C., Lao,C.D., Kim,S.Y., Roberts,J.S., Gruber,S.B., Pienta,K.J., Talpaz,M., and Chinnaiyan,A.M. (2011). Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. *Sci. Transl. Med.* 3, 111ra121.

Saito,Y., Uchida,N., Tanaka,S., Suzuki,N., Tomizawa-Murasawa,M., Sone,A., Najima,Y., Takagi,S., Aoki,Y., Wake,A., Taniguchi,S., Shultz,L.D., and Ishikawa,F. (2010). Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nat. Biotechnol.* 28, 275-280.

Sangiorgi,E. and Capecchi,M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* 40, 915-920.

Scheel,S.K., Porzner,M., Pfeiffer,S., Ormanns,S., Kirchner,T., and Jung,A. (2010). Mutations in the WTX-gene are found in some high-grade microsatellite instable (MSI-H) colorectal cancers. *BMC. Cancer* 10, 413.

Schmiegel,W., Reinacher-Schick,A., Arnold,D., Graeven,U., Heinemann,V., Porschen,R., Riemann,J., Rodel,C., Sauer,R., Wieser,M., Schmitt,W., Schmoll,H.J., Seufferlein,T., Kopp,I., and Pox,C. (2008). [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Z. Gastroenterol.* 46, 799-840.

Schoeftner,S., Sengupta,A.K., Kubicek,S., Mechtler,K., Spahn,L., Koseki,H., Jenuwein,T., and Wutz,A. (2006). Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J.* 25, 3110-3122.

Schubert,J. and Brabletz,T. (2011). p53 Spreads out further: suppression of EMT and stemness by activating miR-200c expression. *Cell Res.* 21, 705-707.

Schuringa,J.J. and Vellenga,E. (2010). Role of the polycomb group gene BMI1 in normal and leukemic hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 294-299.

Schwartz,Y.B. and Pirrotta,V. (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* 8, 9-22.

Schwitalla,S., Fingerle,A.A., Cammareri,P., Nebelsiek,T., Goktuna,S.I., Ziegler,P.K., Canli,O., Heijmans,J., Huels,D.J., Moreaux,G., Rupec,R.A., Gerhard,M., Schmid,R., Barker,N., Clevers,H., Lang,R., Neumann,J., Kirchner,T., Taketo,M.M., van den Brink,G.R., Sansom,O.J., Arkan,M.C., and Greten,F.R. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152, 25-38.

Siddique,H.R. and Saleem,M. (2012). Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells* 30, 372-378.

Simon, J.A. and Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 697-708.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.

Skidan, I. and Steiniger, S.C. (2014). In vivo models for cancer stem cell research: a practical guide for frequently used animal models and available biomarkers. *J. Physiol Pharmacol.* 65, 157-169.

Sladek, N.E., Kollander, R., Sreerama, L., and Kiang, D.T. (2002). Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49, 309-321.

Song, W., Tao, K., Li, H., Jin, C., Song, Z., Li, J., Shi, H., Li, X., Dang, Z., and Dou, K. (2010). Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 101, 1754-1760.

Song, L.B., Li, J., Liao, W.T., Feng, Y., Yu, C.P., Hu, L.J., Kong, Q.L., Xu, L.H., Zhang, X., Liu, W.L., Li, M.Z., Zhang, L., Kang, T.B., Fu, L.W., Huang, W.L., Xia, Y.F., Tsao, S.W., Li, M., Band, V., Band, H., Shi, Q.H., Zeng, Y.X., and Zeng, M.S. (2009). The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J. Clin. Invest* 119, 3626-3636.

Song, L.B., Zeng, M.S., Liao, W.T., Zhang, L., Mo, H.Y., Liu, W.L., Shao, J.Y., Wu, Q.L., Li, M.Z., Xia, Y.F., Fu, L.W., Huang, W.L., Dimri, G.P., Band, V., and Zeng, Y.X. (2006). Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res.* 66, 6225-6232.

Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.

Suter, C.M., Norrie, M., Ku, S.L., Cheong, K.F., Tomlinson, I., and Ward, R.L. (2003). CpG island methylation is a common finding in colorectal cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 88, 413-419.

Tabor, M.H., Clay, M.R., Owen, J.H., Bradford, C.R., Carey, T.E., Wolf, G.T., and Prince, M.E. (2011). Head and neck cancer stem cells: the side population. *Laryngoscope* 121, 527-533.

Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H., Wutz, A., Vidal, M., Elderkin, S., and Brockdorff, N. (2012). RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* 148, 664-678.

- Thasler,W.E., Weiss,T.S., Schillhorn,K., Stoll,P.T., Irrgang,B., and Jauch,K.W. (2003). Charitable State-Controlled Foundation Human Tissue and Cell Research: Ethic and Legal Aspects in the Supply of Surgically Removed Human Tissue For Research in the Academic and Commercial Sector in Germany. *Cell Tissue Bank.* 4, 49-56.
- Thiery,J.P., Acloque,H., Huang,R.Y., and Nieto,M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Tian,H., Biehs,B., Warming,S., Leong,K.G., Rangell,L., Klein,O.D., and de Sauvage,F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478, 255-259.
- Todaro,M., Alea,M.P., Di Stefano,A.B., Cammareri,P., Vermeulen,L., Iovino,F., Tripodo,C., Russo,A., Gulotta,G., Medema,J.P., and Stassi,G. (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1, 389-402.
- Tsuruo,T. (1990). Multidrug resistance: a transport system of antitumor agents and xenobiotics. *Princess Takamatsu Symp.* 21, 241-251.
- Valtorta,E., Misale,S., Sartore-Bianchi,A., Nagtegaal,I.D., Paraf,F., Lauricella,C., Dimartino,V., Hobor,S., Jacobs,B., Ercolani,C., Lamba,S., Scala,E., Veronese,S., Laurent-Puig,P., Siena,S., Tejpar,S., Mottolise,M., Punt,C.J., Gambacorta,M., Bardelli,A., and Di,N.F. (2013). KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *Int. J. Cancer.*
- van Kemenade,F.J., Raaphorst,F.M., Blokzijl,T., Fieret,E., Hamer,K.M., Satijn,D.P., Otte,A.P., and Meijer,C.J. (2001). Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 97, 3896-3901.
- van Lohuizen M., Verbeek,S., Scheijen,B., Wientjens,E., van der Gulden,H., and Berns,A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.
- Vermeulen,L., De Sousa E Melo, van der Heijden,M., Cameron,K., de Jong,J.H., Borovski,T., Tuynman,J.B., Todaro,M., Merz,C., Rodermond,H., Sprick,M.R., Kemper,K., Richel,D.J., Stassi,G., and Medema,J.P. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* 12, 468-476.
- Visvader,J.E. and Lindeman,G.J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717-728.
- Vogelstein,B., Fearon,E.R., Hamilton,S.R., Kern,S.E., Preisinger,A.C., Leppert,M., Nakamura,Y., White,R., Smits,A.M., and Bos,J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525-532.

Voncken, J.W., Niessen, H., Neufeld, B., Rennefahrt, U., Dahlmans, V., Kubben, N., Holzer, B., Ludwig, S., and Rapp, U.R. (2005). MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. *J. Biol. Chem.* 280, 5178-5187.

Vormittag, L., Thurnher, D., Geleff, S., Pammer, J., Heiduschka, G., Brunner, M., Grasl, M.C., and Erovic, B.M. (2009). Co-expression of Bmi-1 and podoplanin predicts overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radio(chemo)therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 73, 913-918.

Vrzalikova, K., Skarda, J., Ehrmann, J., Murray, P.G., Fridman, E., Kopolovic, J., Knizetova, P., Hajdich, M., Klein, J., Kolek, V., Radova, L., and Kolar, Z. (2008). Prognostic value of Bmi-1 oncoprotein expression in NSCLC patients: a tissue microarray study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134, 1037-1042.

Wang, H., Pan, K., Zhang, H.K., Weng, D.S., Zhou, J., Li, J.J., Huang, W., Song, H.F., Chen, M.S., and Xia, J.C. (2008). Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134, 535-541.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.

Weinstein, I.B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297, 63-64.

Wu, X., Johansen, J.V., and Helin, K. (2013). Fbxl10/Kdm2b recruits polycomb repressive complex 1 to CpG islands and regulates H2A ubiquitylation. *Mol. Cell* 49, 1134-1146.

Wu, J., Hu, D., Yang, G., Zhou, J., Yang, C., Gao, Y., and Zhu, Z. (2011). Down-regulation of BMI-1 cooperates with artemisinin on growth inhibition of nasopharyngeal carcinoma cells. *J. Cell Biochem.* 112, 1938-1948.

Wu, K.J. (2011). Direct activation of Bmi1 by Twist1: implications in cancer stemness, epithelial-mesenchymal transition, and clinical significance. *Chang Gung. Med. J.* 34, 229-238.

Yan, K.S., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S.C., Amieva, M.R., Sangiorgi, E., Capecchi, M.R., and Kuo, C.J. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 466-471.

Yang, M.H., Hsu, D.S., Wang, H.W., Wang, H.J., Lan, H.Y., Yang, W.H., Huang, C.H., Kao, S.Y., Tzeng, C.H., Tai, S.K., Chang, S.Y., Lee, O.K., and Wu, K.J. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 12, 982-992.

Yang,J., Chai,L., Liu,F., Fink,L.M., Lin,P., Silberstein,L.E., Amin,H.M., Ward,D.C., and Ma,Y. (2007). Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 10494-10499.

Yilmaz,M. and Christofori,G. (2010). Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol. Cancer Res.* *8*, 629-642.

Yin,T., Wei,H., Gou,S., Shi,P., Yang,Z., Zhao,G., and Wang,C. (2011). Cancer stem-like cells enriched in panc-1 spheres possess increased migration ability and resistance to gemcitabine. *Int. J. Mol. Sci.* *12*, 1595-1604.

Yu,T., Chen,X., Zhang,W., Colon,D., Shi,J., Napier,D., Rychahou,P., Lu,W., Lee,E.Y., Weiss,H.L., Evers,B.M., and Liu,C. (2012). Regulation of the potential marker for intestinal cells, Bmi1, by beta-catenin and the zinc finger protein KLF4: implications for colon cancer. *J. Biol. Chem.* *287*, 3760-3768.

Yu,C.C., Lo,W.L., Chen,Y.W., Huang,P.I., Hsu,H.S., Tseng,L.M., Hung,S.C., Kao,S.Y., Chang,C.J., and Chiou,S.H. (2011). Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. *J. Oncol.* *2011*.

Zhang,S., Balch,C., Chan,M.W., Lai,H.C., Matei,D., Schilder,J.M., Yan,P.S., Huang,T.H., and Nephew,K.P. (2008). Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* *68*, 4311-4320.

Zhao,L., Li,W., Zang,W., Liu,Z., Xu,X., Yu,H., Yang,Q., and Jia,J. (2013). JMJD2B promotes epithelial-mesenchymal transition by cooperating with beta-catenin and enhances gastric cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.* *19*, 6419-6429.

Zheng,S., Chen,P., McMillan,A., Lafuente,A., Lafuente,M.J., Ballesta,A., Trias,M., and Wiencke,J.K. (2000). Correlations of partial and extensive methylation at the p14(ARF) locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors. *Carcinogenesis* *21*, 2057-2064.

7. Anhang

7.1 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Die Bedeutung von BMI1 beim Cancer-Stem-Cell-Phänotyp kolorektaler Krebszellen“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

7.2 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Andreas Jung bedanken, der mir sehr viel Geduld entgegen brachte und durch zahlreiche Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde.

Daneben möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Jung bedanken, die mir mit ihrem Fachwissen und ihren Ideen immer wieder den nötigen Anstoß gegeben hat. Ein ganz besonderer Dank geht an Sabine Sagebiel, Stefanie Jaitner, Alexandra Schindler, Jana Reiche und Dr. Silvio Scheel.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner als Direktor des Pathologischen Instituts der LMU möchte ich vor allem für die anhaltende Unterstützung meiner Doktorarbeit danken. Für die bereitgestellten Arbeitsbedingungen, die sehr zum Gelingen meiner Doktorarbeit beitrugen, möchte ich zudem allen Kollegen am Pathologischen Institut der LMU danken.

Ein weiterer großer Dank geht an alle Kooperationspartner - deren Einsatz die Bearbeitung von Teilaspekten meiner Forschungsarbeit erst ermöglicht hat. In erster Linie möchte ich mich bei der Klinische Forschergruppe "Molekulare Tumorbilogie" unter Leitung von Herrn PD Dr. Klaus-Peter Janssen bedanken, im Besonderen bei Larissa Kistner und Dr. Ulrich Nitsche. Weiterhin gilt mein Dank der "*Flow Cytometry Core Unit*" unter Leitung von Dr. Matthias Schiemann, außerdem Dr. Dr. med. Jens Neumann, Prof. Dr. Heiko Hermeking und Rene Jackstadt.

Mein größter Dank gilt meiner Familie - ganz besonders meinen Eltern, die mir den Weg bis zur Dissertation bereitet haben und meiner Frau Veronika, die mich stets bestärkt und mir den Rücken frei gehalten hat, damit ich diese Dissertation verwirklichen konnte.